UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Bethânia Salamoni Grochanke

Efeito da exposição crônica ao material particulado fino nos parâmetros de estresse oxidativo em pulmões de camundongos submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica

Porto Alegre
2015

Bethânia Salamoni Grochanke

Efeito da exposição crônica ao material particulado fino nos parâmetros de estresse oxidativo em pulmões de camundongos submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra.Claudia Ramos Rhoden
Co-orientador: Dr. Thiago Gomes Heck

Porto Alegre
2015

Agradecimentos

Aos meus pais (Erni e Yolanda) e manos (Alexandre, Rafael e Humberto) minha família, meu maior porto seguro! Agradeço pelo apoio e amor sem precedentes, pelos incansáveis esforços em me fazer feliz e tornar mais fáceis os momentos de dificuldade. Pela constante torcida. Não tenho palavras para agradecer.

Ao meu esposo Guilherme pela paciência, respeito, pelo apoio sempre, pelas palavras de incentivo, conversas e muitos conselhos. Pelo melhor abraço de carinho e amor.

À professora orientadora Dra. Claudia Ramos Rhoden, pela oportunidade de realização deste estudo, pelos ensinamentos transmitidos. Por tornar os momentos mais alegres, descontraídos e agradáveis de trabalhar.

Ao professor co-orientador e amigo Dr. Thiago Gomes Heck, pelo constante incentivo a buscar mais e mais conhecimentos, pela confiança e oportunidade de crescimento com sabedoria. Por tornar o Laboratório de Ensaios Biológicos um constante espaço de aprendizado.

À professora, amiga e sempre orientadora Dra. Mirna Stela Ludwig, pela paciência em transmitir o saber. Pelos momentos de descontração e discussão.

Ao amigo Maciel pela amizade, pelas risadas, pelos desabafos e certamente pelos ensinamentos.

As amigas Pauline e Fernanda pelo companheirismo, pelas idas semanais a Porto Alegre, pela ajuda incondicional neste período.

Aos amigos e colegas do GPeF Eloisa, Analú, Eliara, Maicon, Renan, Yohanna e Iberê pela disposição em ajudar, pela amizade, convivência, pelas risadas, pelos almoços e muitas horas juntos no laboratório. Obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica Gabi, Ale, Marlise, Paulo, Marcella, Alan, Maurício, Grazi, Prica e Karen, pelos momentos de alegria longe de casa, pela imensurável acolhida de vocês.

À Deus por me escutar e iluminar meu o caminho.

OBRIGADA!!!

.

Resumo

A obesidade e a exposição a poluentes são fatores que, apesar de independentes, estão fortemente associados à morbidade e mortalidade em seres humanos, sendo considerados problemas de saúde mundiais. Indivíduos obesos apresentam maior sensibilidade aos efeitos da poluição no desenvolvimento de doenças do sistema pulmonar, embora existam poucas evidências sobre os mecanismos fisiopatológicos deste processo. A exposição a poluentes e a condição de obesidade prejudicam as defesas antioxidantes, podendo desencadear uma série de alterações no estado redox do organismo. O processo de estresse oxidativo sistêmico gerado pela combinação entre MP e obesidade pode agravar o quadro pró-oxidativo do pulmão e iniciar prejuízos subclínicos. Assim, avaliamos os parâmetros oxidativos pulmonares decorrentes da exposição crônica ao material particulado fino, em modelo experimental utilizando 55 camundongos B6 (B6129SF2/J), que foram submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (60% de gordura) por 24 semanas, sendo que a partir da 12ª semana, foram também submetidos à instilação intranasal de 5µg/10µL de material particulado fino ($MP_{2,5}$), diariamente. Neste trabalho, a associação entre o consumo de dieta hiperlipídica e a exposição à poluição causaram dano oxidativo à proteínas e modificaram atividade enzimática antioxidante pulmonar, aumentando a atividade da enzima superóxido dismutase SOD. Esta associação (HDF+$PM_{2,5}$) também causou o aumento da razão SOD/CAT, o que pode representar um desequilíbrio na defesa antioxidante pulmonar e contribuir para o dano oxidativo pulmonar. Não houve alterações na expressão de HSP pulmonar.

Palavras chave: estresse oxidativo, poluição atmosférica, proteína do choque térmico, dieta hiperlipídica, pulmão.

Abstract

Obesity and exposure to pollutants are factors that, although independent, are strongly associated with morbidity and mortality in humans and are considered world's health problems. Obese individuals are more sensitive to the effects of pollution on the development of the pulmonary system diseases, although there is little evidence on the pathophysiology of this process. Exposure to pollutants and obesity condition affect the antioxidant defenses, which can trigger a number of changes in the redox state of the organism. The systemic oxidative stress process generated by the combination of PM and obesity can aggravate lung pro-oxidative above and start subclinical losses. We evaluated the pulmonary oxidative parameters resulting from chronic exposure to fine particulate matter in an experimental model using 55 mice B6 (B6129SF2/J), which were submitted to the consumption of high fat diet for 24 weeks, and from the 12^{th} week, were also intranasal instillation of undergoing 5μg/10μL of fine particulate matter ($PM_{2.5}$) daily. In this study, the association between the consumption of high fat diet and exposure to pollution caused oxidative damage to proteins and modified pulmonary antioxidant enzyme activity by increasing the activity of superoxide dismutase SOD enzyme. This association (HDF + $PM_{2.5}$) also caused increased the ratio SOD/CAT, which may represent an imbalance in pulmonary antioxidant defense and contribute to the pulmonary oxidative damage. There were no changes in the expression of pulmonary HSP.

Keywords: oxidative stress, air pollution, heat shock protein, high fat diet, lung.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8
1.1 Obesidade 8
1.2 Poluição atmosférica 12
1.3 Estresse Oxidativo 14
1.3.1 Peroxidação Lipídica (LPO) 18
1.3.2 Dano oxidativo a proteínas 20
1.3.3 Dano oxidativo ao DNA 21
1.3.4 Sistema de Defesas Antioxidantes 22
1.4 Proteínas do choque térmico 25
2. OBESIDADE E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA 27
3. OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo Geral 31
3.2 Objetivos específicos 31
4. REFERÊNCIAS 32
5. ARTIGO 42
6. CONCLUSÃO 66
7. ANEXOS 67
7.1 Normas do periódico Inhalation Toxicology 67
7.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade, atualmente, é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, sendo um dos maiores desafios de saúde pública do século 21. A obesidade adulta é mais comum do que a subnutrição em nível mundial, sendo que há cerca de 475 milhões de adultos obesos e mais do que o dobro deste índice de indivíduos com sobrepeso (IASO, 2012). Sua prevalência triplicou desde 1980 e o número de pessoas acometidas com esta doença continua aumentando a um ritmo alarmante. O sobrepeso e a obesidade são responsáveis por cerca de 3,4 milhões de mortes a cada ano, estando associadas em 44% dos casos com diabetes, 23% com doenças isquêmicas do coração e entre 7 e 41% com alguns tipos de câncer (OMS, 2014).

O principal critério utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como diagnóstico para determinação da obesidade é o índice de massa corporal (IMC). Consideram-se obesos indivíduos com IMC ≥ 30Kg/m^2, apresentando risco moderado para desenvolvimento de morbidades associadas. Associado ao IMC, medidas de distribuição de gordura, como circunferência abdominal também são critérios de diagnóstico para avaliar obesidade e risco para desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doença cardiovascular. Assim, quanto maior o IMC e a circunferência abdominal, maior será o risco para o desenvolvimento de outras comorbidades (OMS, 2014), como dislipidemias, DM2, aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Schuster, 2010; Rosini et al, 2012).

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo de adipócitos, causado pelo desequilíbrio energético, ou seja, quando a ingestão de calorias é superior ao gasto energético. O desenvolvimento da obesidade pode ser decorrente de diversos fatores, dentre os quais se destacam os ambientais, como o consumo de dietas inadequadas e o sedentarismo (Rosini et al, 2012). O padrão de vida em sociedades modernas e, principalmente, em países desenvolvidos, denominado “dieta ocidental”, é caracterizado pelo consumo de alimentos com elevada densidade energética e parcialmente resultante do elevado conteúdo de lipídios nesses alimentos (Roberts; Barnard, 2005). A elevada quantidade de lipídios presente na dieta

induz a um alto consumo de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (Astrup et al., 2000). Os ácidos graxos saturados e poli-insaturados estão relacionados com lesões teciduais e microvasculares, aterosclerose, embolia pulmonar gordurosa e síndrome de insuficiência respiratória do adulto (Rosini et al., 2012).

A relação entre obesidade e o risco para o desenvolvimento de outras doenças metabólicas pode estar relacionada com a perda da homeostase energética, ou seja, perda da regulação adaptativa de diversas funções fisiológicas, como a utilização da glicose em tecidos periféricos e a secreção hormonal deficiente (Burcelin et al., 2002).

Estudos epidemiológicos têm demostrado que o excesso de tecido adiposo, principalmente no abdômen, está relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Rosini et al, 2012). Além disso, indivíduos obesos apresentam aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição da capacidade antioxidante, bem como aumento de marcadores inflamatórios e, portanto são predispostos a desenvolver perfil pró-oxidativo (Sharma et al., 2011). A obesidade é reconhecida como processo de inflamação crônica subclínica (Wellen e Hotamisligil, 2005), de modo que o tecido adiposo é a principal fonte de mediadores inflamatórios e adipocitocinas, os quais podem conduzir a ativação inflamatória nos pulmões e, consequentemente, disfunção de órgãos de todos os sistemas (Jung et al., 2013).

Em estudos de obesidade, têm sido constantemente utilizadas metodologias de uso crônico de dietas hiperlipídicas, com intuito de observar alterações no metabolismo de roedores, bem como para investigar disfunções endoteliais devido a grande semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em seres humanos (Estadella et al., 2004).

Estudos indicam que a ingestão de alimentos com mais de 30% de gordura em kcal por sete semanas causa obesidade em roedores (West et al., 1992) e que dietas iniciadas no desmame (21 dias) e mantidas até a vida adulta aumentam o risco para o desenvolvimento de DM2 (Buettner et al., 2007). No entanto, há relatos que animais considerados jovens (até três meses de idade) apresentam o metabolismo mais acelerado comparado a animais

mais velhos, proporcionando maior ganho de massa magra e, portanto, sendo utilizados animais com aproximadamente 100 dias para o início da intervenção com dietas hiperlipídicas. Neste sentido, dietas com teor de gordura animal superior a 40% causam aumento do peso corporal em camundongos a partir da 12ª semana (Jung, et al. 2013), podendo induzir resistência à insulina (Buettner et al., 2007).

O tipo de gordura utilizada na composição da dieta hiperlipídica pode influenciar no desenvolvimento da obesidade. Salienta-se que as as gorduras saturada e monoinsaturada, como a banha de porco, são as mais recomendadas para o desenvolvimento de obesidade em modelos experimentais. Estas gorduras são capazes de promover obesidade e resistência à insulina de forma mais pronunciada quando comparadas à gordura poli-insaturada, como óleos vegetais, uma vez que a última gera aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado (Buettner et al., 2007).

No estudo de White et al. (2013), foi necessário 10 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica a base de banha de porco para um modelo consistente de obesidade em camundongos Swiss, os quais apresentaram peso do tecido adiposo oito vezes maior e índice de adiposidade dez vezes maior comparados aos animais controles.

Os animais submetidos a este consumo alimentar podem apresentar alterações metabólicas, como aumento da glicemia (Vincent et al., 2001). Burcelin et al. (2002) encontraram altos níveis de glicemia após três meses de consumo de dieta hiperlipídica, as quais permanecem elevadas por nove meses em camundongos (C57BL/6J). É importante ressaltar que, neste mesmo estudo, todos os animais que receberam a dieta hiperlipídica tornaram-se resistentes à insulina, mesmo com taxas de depuração de glicose (*clearance*) muito variáveis (Burcelin et al., 2002).

Associado ao aumento da glicemia, animais que recebem dietas hiperlipídicas tendem a apresentar alterações no perfil lipídico, como aumento de triglicerídeos. O peso elevado é um determinante de altos níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL e baixos níveis de HDL (Kolovou et al., 2005). Em relação ao colesterol total, os dados existentes em modelos experimentais ainda são inconsistentes, porém estudos sugerem que dietas

hiperlipídicas sem a adição do colesterol na ração dificilmente causam modificações no colesterol sérico em animais, mesmo após 12 semanas de indução de dieta com 42% de lipídios em ratos Wistar (Buettner et al., 2007). Fraloub et al. (2010), também não observaram modificações nos níveis de colesterol total após 16 semanas de indução utilizando dieta com 60% de lipídios em camundongos C57BL/6.

Com relação a parâmetros de estresse oxidativo, Cani et al. (2008) encontraram, em camundongos C57bl6/J tratados com dieta hiperlipídica com 72% de gordura por 4 semanas, aumento de peroxidação lipídica no tecido adiposo visceral. A condição metabólica alterada como o aumento de triglicerídeos está relacionada com a produção de ERO, principalmente o aumento de radical superóxido e diminuição de óxido nítrico (Rosini et al., 2012), causando estresse oxidativo.

Neste sentido, a obesidade é um fator de preocupação para a saúde, sendo considerado um processo de inflamação crônica. O aumento do tecido adiposo em obesos pode ser visto como ponto chave para o início dos processos inflamatórios e oxidativos em tecidos, como o pulmão. Os adipócitos conduzem a ativação pró-inflamatória e pró-oxidativa para o pulmão podendo causar lesões teciduais, embolia pulmonar gordurosa e insuficiência respiratória.

Obesos mórbidos (IMC > 40Kg/m^2) apresentam aumento da taxa respiratória e consequente aumento da frequência respiratória em comparação com indivíduos sadios. Além disso, os tempos inspiratório e expiratório são afetados pela obesidade, embora ainda não se tenha uma certeza sobre a variação exata, embora o que se sabe é que a função respiratória como um todo é reduzida em indivíduos com obesidade (Littleton, 2012). Com relação aos volumes pulmonares, o volume de reserva expiratório tende a diminuir conforme o aumento do IMC (Jones et al., 2006), devido ao deslocamento do diafragma no abdômen pela presença de gordura abdominal em excesso. Outra hipótese é que a adiposidade pode comprimir a caixa torácica o que leva a uma diminuição do volume de reserva expiratório (Koenig, 2006).

Neste sentido, a gordura abdominal e a torácica podem exercer efeitos prejudiciais diretos sobre o movimento descendente do diafragma e nas propriedades da parede torácica, enquanto a gordura nos quadris e coxas seria

improvável que tenha qualquer efeito mecânico direto sobre os pulmões (Salome et al., 2010). Embora, o principal efeito da obesidade é sobre os volumes pulmonares, com possível obstrução das vias aéreas (Salome et al., 2010).

1.2 Poluição atmosférica

Entende-se por poluição atmosférica toda a contaminação do ambiente por agente químico, físico ou biológico capaz de modificar as características naturais da atmosfera e causar prejuízos à saúde (EPA, 2013).

A exposição à poluição atmosférica está fortemente associada à morbidade e à mortalidade respiratória em seres humanos (Brook et al., 2010), sendo responsável por cerca de 7 milhões de mortes no ano de 2012 e considerada como risco ambiental para a saúde mundial (OMS, 2014).

A poluição pode ser classificada de acordo com as fontes poluidoras, sendo fontes naturais ou biogênicas e antropogênicas (EPA, 2013). As fontes naturais ou biogênicas são principalmente decorrentes da maresia e vulcanismo. As fontes antropogênicas, incluem fontes móveis e estacionárias. Poluentes derivados de fontes móveis são decorrentes da queima de combustíveis, considerando-se principalmente os automóveis e caminhões, os quais são divididos em: leves, que utilizam principalmente gasolina ou álcool, leves comerciais, que utilizam gás natural veicular ou óleo diesel e, que utilizam somente óleo diesel. Fontes estacionárias são fontes fixas, como usinas de energia e indústrias (EPA, 2013).

Dentre os poluentes do ar, destaca-se o material particulado (MP), o qual apresenta alto poder de penetração através das vias aéreas. O MP é uma mistura complexa de partículas sólidas e líquidas extremamente pequenas suspensas no ar. Esta mistura de partículas é composta por poeira e fumaça, ácidos, metais e produtos químicos orgânicos formados a partir de processos de combustão, incluindo fontes como veículos, usinas, incêndios, queimadas agrícolas e processos industriais (EPA, 2013).

Segundo a OMS, as partículas são classificadas conforme o seu diâmetro aerodinâmico. Partículas grosseiras apresentam diâmetro entre 10 μm

a 2,5 μm (MP_{10}); partículas finas têm diâmetro entre 2,5 μm a 0,1 μm ($MP_{2,5}$) e partículas ultrafinas apresentam diâmetro menor que 0,1 μm ($MP_{0,1}$). Estas partículas podem ser emitidas para a atmosfera (partículas primárias) ou serem formadas na atmosfera a partir de reações químicas entre poluentes gasosos, como o dióxido de enxofre (partículas secundárias).

O tamanho das partículas está diretamente ligado ao seu potencial para causar problemas de saúde, ou seja, a inalação e a toxicidade são diretamente influenciadas pelo tamanho aerodinâmico das partículas (Tong et al., 2010). Quanto menor a partícula, maior a sua capacidade de penetrar as vias aéreas e de atingir a corrente sanguínea, evoluindo para danos sistêmicos (Reich et al., 2008). O MP_{10} é considerado a fração inalável, penetrando através das vias aéreas superiores; o $MP_{2,5}$, após penetrar as vias aéreas superiores, apresenta capacidade de invadir o trato respiratório e o sistema vascular (Pearson et al., 2010).

Considerando o grande número de pessoas expostas a poluição do ar e baseado em estudos epidemiológicos e experimentais, é evidente afirmar que a poluição é um importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias relacionadas ao sistema pulmonar (Emmerechts e Hoylaerts, 2012). Estudos epidemiológicos de Pope et al. (2002) sugerem que a prolongada exposição ao MP, principalmente às partículas consideradas finas ($MP_{2,5}$) estão associados a mortalidade por doenças respiratórias e por câncer de pulmão.

Variações diárias e sazonais de concentração do MP têm sido associadas ao aumento da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, bem como aumento de internações hospitalares por doenças pulmonares (Martinelli et al., 2013; Brook et al., 2010; Dominici et al., 2006). Cabe salientar também que os efeitos adversos à saúde, decorrentes da exposição de partículas da poluição atmosférica, variam de acordo com o tempo de exposição, curto ou longo prazo. Em estudo epidemiológico com mais de 11 milhões de pessoas, os autores afirmam que o aumento de 10 $\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$ em 24 horas aumenta em 1,28 % as hospitalizações por insuficiência cardíaca (Dominici et al., 2006). Além disso, o aumento de 10 $\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$ por cinco dias causa elevação de 2,8 mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) e 2,7 mmHg na pressão arterial diastólica (PAD) em pacientes em reabilitação cardíaca (Zanobetti et al., 2004). Neste contexto, o aumento diário de 10 $\mu g/m^3$

de MP_{10} e 6 $\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$ causa aumento de 0,5 a 1,5 % na mortalidade devido a doenças cardiovasculares (69%) e doenças respiratórias (28%) (Brook et al., 2010).

Neste sentido, sugere-se que exposições repetidas em longo prazo teriam efeitos cumulativos mais persistentes quando comparadas com exposições transitórias de curto prazo (Pope III, Dockery, 2006). Exposições em longo prazo com aumentos de 10 $\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$ estão associadas a risco de mortalidade a 6 % por doenças cardiopulmonares e 8 % a câncer de pulmão (Pope et al., 2002). Destaca-se também que indivíduos com doenças metabólicas, como a obesidade, apresentam risco maior de complicações cardiovasculares (Goldberg et al., 2006) e, portanto, maior sensibilidade aos efeitos da poluição no desenvolvimento de doenças envolvendo o sistema pulmonar (O'Neill et al., 2005; Brunekreef; Holgate, 2002; Pope III; Dockery, 2006; Mills et al., 2009).

O aumento de 10 $\mu g/m^3$ de MP_{10} está associado ao aumento de 4 a 12% de atendimentos em prontos socorros devido a doenças envolvendo o sistema respiratório em crianças e adolescentes e, 4% por doenças cardiovasculares em adultos com idades entre 45 e 64 anos (Braga et al., 2007). Por outro lado, reduções nos níveis de poluição estão associadas a diminuições no número de hospitalizações e óbitos em adultos com mais de 30 anos de idade (Ballester et al., 2008).

Sumarizando, a exposição a partículas do ar, desde as consideradas grosseiras até as ultrafinas, são capazes de causar danos irreversíveis a saúde. As partículas apresentam-se como agentes tóxicos, causando principalmente a indução de mediadores pró-oxidativos por meio do pulmão, levando a transformação destes efeitos locais em efeitos sistêmicos, como a alteração no Sistema Nervoso Autônomo, pela ativação do radical superóxido.

1.3 Estresse Oxidativo

A incapacidade das defesas antioxidantes compensarem a produção de ERO desencadeia um desequilíbrio do estado redox, isto é, estado de oxidação/redução celular, e consequente estresse oxidativo. Estresse oxidativo

é o termo utilizado quando há um aumento nas concentrações de pró-oxidantes resultantes da produção de ERO acima dos níveis fisiológicos, associado ou não a diminuição das defesas antioxidantes (Olszewer, 1992).

As EROs são originárias principalmente do processo de respiração celular. O oxigênio é uma substância vital para a manutenção da vida aeróbia contudo, é um potencial causador de dano oxidativo no processo respiratório. Cerca de 95% do oxigênio que respiramos é convertido para produção de ATP, devido a redução de quatro elétrons de oxigênio a água por via mitocondrial de transporte de elétrons, e os 5% restantes podem ser reduzidos com menos que quatro elétrons, podendo formar metabólitos oxigenados tóxicos, ou seja, ERO (Olszewer, 1992).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos: Radicalares (radicais livres - RL) e Não-radicalares. Entende-se por RL, átomo ou grupo de átomos com um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa, sendo considerados extremamente reativos (Halliwell; Gutteridge, 2007; Augusto, 2011), como o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peroxila ($ROO^{\bullet}$) e a alcoxila ($RO^{\bullet}$); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (Olszewer, 1992). As EROs podem comprometer a membrana lipídica das células e causar danos às proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e tecidual (Martin et al., 2010).

O $O_2^{\bullet-}$ é produzido, em sistemas biológicos, por reações enzimáticas catalisadas por oxidases, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) e xantina oxidase, ou por transporte de elétrons no sistema mitocondrial (Augusto, 2011). O complexo enzimático (NADPH oxidase) atua como doador de elétrons para a redução do oxigênio a superóxido (Figura 1). A NADPH oxidase é constituinte fundamental do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, sendo que o estresse oxidativo pode levar ao consumo permanente de NADPH, resultando em implicações incompatíveis com a sobrevida das células (Mota et al., 2004).

$$NADPH + 2O_2 \longleftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\circ-} + H^+$$

$$2O_2^{\circ-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Figura 1. Reações do complexo enzimático NADPH oxidase na redução do oxigênio a superóxido.

Apesar de o superóxido ser pouco reativo em soluções aquosas (Halliwell; Gutteridge, 2007), pode induzir efeitos nocivos ao sistema biológico ao reagir com radicais como, óxido nítrico (NO) e espécies contendo metais de transição. O aumento deste radical pode contribuir para a redução da biodisponibilidade do NO no tecido pulmonar, o que altera a homeostase pulmonar (Boulden et al., 2006). Além disso, reage inespecificamente com alvos celulares mais próximos, iniciando a oxidação de ácidos graxos poli-insaturandos, causando peroxidação lipídica, desestruturando as membranas lipídicas, alterando a atividade celular e danificando os tecidos (Augusto, 2011).

A produção biológica de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ocorrer por processos químicos e fotoquímicos, e por reações enzimáticas catalisadas por várias oxidases, como NADPH oxidase, xantina oxidase e monoamina oxidase. Além disso, é produzido continuamente a partir do radical superóxido, através da dismutação, seja espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 apresenta baixa reatividade para a maioria das biomoléculas e não é considerado um radical livre por não apresentar um elétron desemparelhado na última camada. No entanto, é considerado um metabólito oxidativo, pois durante sua metabolização ocorre a produção de espécies secundárias que são mais reativas, como radical hidroxil e dióxido de nitrogênio, bem como espécies não radicalares, como ácido hipocloroso (Augusto, 2011).

O radical hidroxil (HO°) é considerado o oxidante mais reativo e forte em sistemas biológicos, reagindo muito rapidamente e indiscriminadamente com a maioria dos alvos biológicos presentes no seu local de formação, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e DNA. Pode ser gerado *in vivo* por quatro grandes processos: radiação ionizante (por exemplo, UV e raio-X); reações catalisadas por íons de metais de transição; decomposição catalisada por

próton de peroxinitrito e decomposição de ozônio (O_3). O radical hidroxil gerado pelo processo de radiação pode ser responsável por danos no DNA e até desenvolvimento de tumor (Augusto, 2011).

Dentre os efeitos adversos à saúde decorrente do estresse oxidativo é possível citar: lesão celular, que envolve o dano das biomoléculas (lipídios, DNA, proteínas, carboidratos), promovendo mutações celulares; senescência, ou seja, envelhecimento das células aumentando a suscetibilidade aos danos e comprometimento da divisão celular do sistema imunológico; e morte celular, pelo dano oxidativo, especialmente ao DNA, através de apoptose, necrose ou mecanismos intermediários entre esses extremos (Halliwell; Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo também pode provocar o aumento da taxa de proliferação celular, na qual as células em resposta ao estresse oxidativo aumentam a taxa de divisão celular, como no caso do câncer de pulmão. A inalação de altas concentrações de poluentes ativa macrófagos, os quais atuam como agentes químicos desencadeando morte celular no interstício pulmonar, liberando mediadores pró-oxidativos, podendo desencadear inflamações alveolares fazendo com que os poluentes atinjam a corrente circulatória e vasos pulmonares (Kumar et al., 2008).

Há três mecanismos principais na promoção dos efeitos nocivos da exposição ao MP devido ao estresse oxidativo. O primeiro é a inflamação sistêmica através da liberação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, leucócitos, plaquetas) liberados pelos pulmões, após exposição ao MP (Martinelli et al., 2013; Yin et al., 2013); o segundo, pela interação do MP com receptores pulmonares, sobre o sistema nervoso autônomo (Rhoden et al., 2005) e o terceiro, pela translocação direta de MP, principalmente partículas ultrafinas (menores que 0,1 μm) através da corrente sanguínea, facilitando a interação com células endoteliais e plaquetas, causando efeitos nocivos na vasculatura e hemostasia (Martinelli et al., 2013), indicando que as partículas inaladas são rapidamente translocadas para o sistema circulatório através de mediadores pulmonares. O MP possui propriedades oxidantes, as quais podem exercer ação pró-inflamatória pulmonar (Rhoden et al, 2005). As partículas finas são capazes de invadir o trato respiratório e tendem a se depositar no interior dos pulmões, interagindo com alvéolos pulmonares (Brook, 2010).

A proliferação celular, por outro lado, pode ser benéfica apresentando um efeito modulador no sistema imunológico, provocando a proliferação de células, como os macrófagos, que são células altamente fagocíticas de restos celulares e células mortas. Estes são considerados produtores da interleucina 1 (IL-1) enquanto fagocitam agentes invasores e ao mesmo tempo estimulam os linfócitos para a ação contra os agentes tóxicos. Neste sentido, a diminuição dos níveis de ERO pode diminuir a proliferação celular, como a superexpressão da enzima catalase na redução dos níveis de peróxido de hidrogênio, o que bloqueia a ação tóxica deste radical (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Neste sentido, outro efeito decorrente do estresse oxidativo, que pode ser considerado benéfico, é o quadro de adaptação celular, ou seja, o aumento das defesas antioxidantes endógenas, como as enzimas SOD, catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (Halliwell; Gutteridge, 2007), bem como tratamentos com antioxidantes exógenos como o N-acetilcisteína são capazes de prevenir o dano pulmonar causado por exposição a partículas do meio ambiente (Rhoden et al., 2004), podendo deixar a célula protegida contra os danos oxidativos.

Como consequência da cascata das reações oxidativas causadas pelas ERO, os radicais e oxidantes tornaram-se causa da maioria das doenças humanas e muitos estudos de intervenção foram projetados para examinar os efeitos de antioxidantes em doenças, principalmente cardiovasculares e neurológicas (Augusto, 2011).

Os principais mecanismos de lesão causados pela ação de ERO são: peroxidação lipídica; oxidação de proteínas e dano oxidativo do DNA.

1.3.1 Peroxidação Lipídica (LPO)

Os lipídios presentes nas membranas celulares são suscetíveis e sofrem o processo da LPO. A peroxidação lipídica é uma reação com ácidos graxos poli-insaturados, que gera alterações na permeabilidade e capacidade de manter o equilíbrio hídrico da membrana celular (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Existem grande quantidades de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas das células e organelas, sendo que a fluidez da membrana

relaciona-se com a presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol. Assim, processo de peroxidação lipídica é causador de danos na camada lipídica o que diminui a fluidez da membrana (Halliwell; Gutteridge, 2007).

A LPO envolve três etapas: iniciação, propagação e terminação (Augusto, 2006). A iniciação ocorre quando um RL formado reage com ácidos graxos poli-insaturados, em reações de abstração de hidrogênio de um grupo metileno, formando um radical de carbono. A propagação se dá quando o radical de carbono, formado na etapa de iniciação reage com moléculas de oxigênio produzindo radical peroxil, os quais propagam a reação, condicionando uma reação em cadeia e resultando como consequência grande alteração da estrutura da membrana. A terminação ocorre quando dois radicais livres reagem entre si formando um produto não radicalar (Augusto, 2006).

Os marcadores de peroxidação lipídica são classificados em primários (hidroperóxidos lipídicos) e secundários, os quais derivam da ruptura dos hidroperóxidos lipídicos. Para monitorar o dano oxidativo lipídico, podem-se quantificar os produtos formados durante o processo de peroxidação lipídica (França et al., 2013). Um dos marcadores mais estudados resultante desta oxidação é o malondialdeído (MDA), embora outros produtos tenham sido explorados como biomarcadores, os quais incluem os isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, produtos fluorescentes e ensaios de resistência à oxidação (HO, et al., 2013).

Dentre as diversas metodologias utilizadas, destaca-se o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege; Aust, 1978). A técnica de TBARS mensura a quantidade de malondialdeido (MDA) formado na reação de LPO. O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica e cuja absorção ocorre em 532 nm. Faz-se necessário o monitoramento do MDA formado, uma vez que este reage com as bases do DNA, principalmente com a base nitrogenada guanina, podendo gerar mutações genéticas (Halliwell; Gutteridge, 2007). Apesar de ser uma técnica considerada simples e de fácil execução, este teste não é específico para o MDA, o TBA reage com uma ampla variedade de outros compostos como açúcares, aminoácidos e

proteínas, por isso é denominado teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (França et al., 2013).

A possibilidade de reação do TBA com substâncias intervenientes tem como consequência superestimar a extensão do processo de peroxidação lipídica, decorrente da detecção não só do MDA, mas também de compostos interferentes (França et al., 2013), por isso se faz necessário a mensuração de outros parâmetros para a determinação do estresse oxidativo, como por exemplo a mensuração das enzimas antioxidantes.

Estudos indicam que os pulmões representam a porta de entrada de partículas do meio ambiente e, portanto suscetíveis a danos oxidativos lipídicos. Exposições à poluição, por *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) ou por MP urbano, causa aumento de LPO nos pulmões de animais (Heck et al., 2014a; Pereira et al., 2007).

Neste sentido, Gurgueira et al. (2002), observaram que 24h, após uma exposição aguda de 5h em ambiente poluído, os pulmões são capazes de recuperar o balanço homeostático e retornar a valores considerados normais de LPO, o que sugere que os pulmões podem compensar aumentos transitórios nos níveis de partículas. Por outro lado, estudos realizados com exposição crônica a doses de 500µg de ROFA, por instilação intranasal, não mostraram alterações na concentração de MDA formado (Damiani et al., 2012).

1.3.2 Dano oxidativo a proteínas

As ERO podem causar danos diretamente às proteínas causando diversas disfunções celulares, como inativação de suas atividades, danos nos receptores e transporte celular. Devido ao estresse oxidativo, ocorre a fragmentação das cadeias e oxidação de praticamente todos os aminoácidos, com produção de compostos carbonilados, em especial prolina, arginina e lisina. Adicionalmente, proteínas podem conter sítios de ligação com metais que são especialmente susceptíveis a reações reversíveis de oxidação e redução, as quais podem produzir uma sequência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que degradam tais proteínas, do mesmo modo, há formação de produtos de adição com peróxidos lipídicos e com hidroxialdeídos derivados de lipídios insaturados. Muitas proteínas

intracelulares têm grupos sulfidrila reativos em resíduos de cisteína, que podem ser oxidados a dissulfeto ou ácidos cistéicos, que podem ser novamente reduzidos metabolicamente (Vasconcelos et al., 2007).

Frente a desafios, ocorre o aumento da oxidação de proteínas (Pinho et al., 2006) levando a um quadro pró-oxidativo. A carbonilação proteica pode ser considerada um bom marcador para o estresse oxidativo. Estudos recentes têm demostrado que a carbonilação de proteínas pode mediar os processos redox de sinalização durante os vários estágios das doenças (Suzuki et al., 2010).

1.3.3 Dano oxidativo ao DNA

As ERO, principalmente, o radical hidroxil, interagem com o DNA podendo gerar mutações e induzir apoptose. Este radical ataca as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila), com ataque preferencial à guanina. Como resultado, ocorre a quebra da cadeia do DNA, alterações na replicação dos pares de base de aminoácidos transcritos e ligação cruzada entre as fitas levando a mutações e apoptose, o que interfere no funcionamento celular (Vasconcelos et al., 2007).

Para avaliar danos ao DNA de células individuais, um dos métodos mais utilizados é o ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única, o qual possibilita quantificar quebras da fita do DNA. As células são incluídas em gel de agarose, sendo que as membranas celulares, núcleo e organelas são rompidas através de soluções, sendo submetidos à eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido anodo e quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. O DNA danificado revela-se de forma similar a de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram (Belpaeme et al., 1998).

Essa é uma técnica simples, rápida e sensível para medir quebra no DNA de células individualizadas, e tem sido usada para vários estudos para investigar o efeito de ERO no DNA.

1.3.4 Sistema de Defesas Antioxidantes

Podemos considerar que evolutivamente, a exposição à ERO provocou o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante para a manutenção da homeostase em sistemas aeróbios. O equilíbrio entre os agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante é essencial para proteger as células contra os danos oxidativos. O sistema de defesa antioxidante é principalmente constituído por linhas de defesa enzimáticas e não enzimáticas (Bianchi e Antunes, 1999).

Conforme os autores Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes atuam através de diferentes mecanismos na proteção dos organismos vivos, como pelo impedimento de formação de radicais livres, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e cobre; intercepção dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, proteínas e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular; reparo das lesões, remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas; adaptação do organismo em resposta a geração de radicais, como por exemplo, o aumento da síntese de enzimas antioxidantes.

Os sistemas de defesa enzimáticos incluem três enzimas clássicas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), estas enzimas são consideradas as primeiras linhas de defesa contra as ERO. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção da oxidação do DNA, proteínas e membrana lipídica (Jordan, 2012).

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido para a formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 2). Existem basicamente duas formas de SOD: mitocondrial e citoplasmática. A forma da enzima SOD com cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citosol e a forma da enzima SOD com Manganês (Mn-SOD), localiza-se primariamente na mitocôndria (Ferreira e Matsubara, 1997).

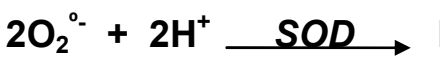

Figura 2. Reação catalisada pela enzima superóxido dismutase.

O peróxido de hidrogênio, que é produto da dismutação dos superóxidos, é menos tóxico para os tecidos, porém pode atravessar a membrana do DNA, reagir com metais ligados ao DNA e gerar radical hidroxila. O processo de formação do radical hidroxila pode ser interrompido através da ação da CAT e da GPx, estas enzimas convertem rapidamente o peróxido de hidrogênio a moléculas de água por meio de reações de Fenton, representando um mecanismo de proteção e prevenção do dano oxidativo.

A enzima CAT é uma hemoproteína com atividade peroxidase específica para H_2O_2, localiza-se principalmente, na mitocôndria e peroxissomos, exceto nos eritrócitos, onde é encontrada no citosol (Ferro et al., 2010), é amplamente distribuída nos tecidos como fígado, rins e em baixas concentrações no tecido cerebral (Halliwell; Gutteridge, 2007). As enzimas catalases são responsáveis pela inativação, no interior da célula, do peróxido de hidrogênio em água (Figura 3), situação esta que impede a cascata de formação de novos subprodutos decorrentes da sucessiva redução monovalente destes intermediários oxidantes (Ferro et al., 2010). As enzimas peroxidases o removem com auxílio de substrato, como o selênio (Halliwell; Gutteridge, 2007).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$$

Figura 3. Reação catalisada pela enzima catalase.

A GPx, localiza-se no citosol e na matriz mitocondrial, é uma enzima selênio-dependente, a qual catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e álcool, com a glutationa (GSH) como doador de elétrons (Figura 4) (Halliwell; Gutteridge, 2007).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Figura 4. Reação catalisada pela enzima glutationa peroxidase.

A exposição de animais a concentrações aumentadas de superóxido, podendo ser atribuído a situações estressoras, como a poluição e dieta hiperlipídica, frequentemente aumenta a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx nos tecidos, o que indica que a quantidade normalmente presente é suficiente somente para equilibrar as taxas normais de produção de ERO no organismo e portanto, preservar a integridade celular (Giannerini et al., 2001).

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, como glutamina, cisteína e glicina, sendo considerada um marcador da saúde celular e um possível indicador de lesão oxidante quando os seus níveis apresentam-se baixos. Apresenta-se, no organismo, sob as formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), atuando como defesa antioxidante não enzimática direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, o metabolismo e a proteção celular (Jordão JR et al, 1998). A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO (Vasconcelos et al., 2007).

Sob as condições de estresse oxidativo, ou seja, excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá o desequilíbrio entre os níveis de GSH e GSSG. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH, de modo que o aumento de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, o que favorece a formação de pontes dissulfeto nas proteínas portadoras de grupamento tiol. As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções, sendo reversível devido a ação da GSH (Ferreira e Matsubara, 1997). Curiosamente, esta enzima está presente em baixas concentrações no pulmão de animais expostos a partículas de exaustão de diesel (Dong et al., 2005).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático também inclui compostos oriundos de uma dieta saudável, como vegetais, legumes, frutas, grãos entre outros, os quais são ricos em compostos vitamínicos antioxidantes, como ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol e β-caroteno (precursores das vitaminas E e A) (Barbosa et al., 2010).

A vitamina C é um dos principais antioxidantes não enzimáticos, esta vitamina atua na fase aquosa como excelente antioxidante aos radicais livres, por outro lado é incapaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a

peroxidação lipídica. Estudos mostram que na presença de metais de transição como, por exemplo, o ferro, a vitamina C pode desempenhar ação oxidante e produzir ERO como radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (Bianchi e Antunes, 1999).

A vitamina E é um dos componentes dos óleos vegetais e pode ser encontrada na natureza sob quatro formas diferentes α, β, γ e δ-tocoferol, sendo que a forma α-tocoferol é mais amplamente distribuída nos tecidos e no plasma com função principal de antioxidante hidrogênio (Bianchi e Antunes, 1999).

Neste sentido salienta-se que uma dieta rica em frutas e vegetais possa atenuar a produção de ERO e consequentemente o estresse oxidativo, devido a mudanças no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes.

1.4 Proteínas do choque térmico

Frente a alterações do meio externo ou interno, os organismos vivos buscam alternativas para a manutenção da homeostase por meio de mecanismos regulatórios geradores de mudanças e adaptações moleculares ou sistêmicas. Os desafios mobilizam uma vasta lista de adaptações celulares comuns que envolvem a expressão, síntese e exportação de proteínas (Morimoto et al., 1990). Em condições fisiológicas normais, as células interagem umas com as outras sincronizando a atividade metabólica, a expressão gênica e outros processos celulares básicos. Entre os sinais produzidos, encontram-se as proteínas do estresse, também denominadas proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSPs) (De Maio, 2011). As HSPs são proteínas altamente conservadas durante a evolução das espécies, sendo que podem ser encontradas em organismos eucariontes e procariontes (Robert, 2003).

São expressas constitutivamente em condições normais, sendo induzidas por grande variedade de fatores estressores, como metais pesados e radiação UV, infecção por bactérias ou parasitas, inflamação e estresse oxidativo, além de agentes fisiológicos como fatores de crescimento (Henderson, 2010). Foram descritas primeiramente pela sua ação *chaperona*,

devido à capacidade de impedir a agregação de proteínas no ambiente intracelular, auxiliar no remodelamento e manutenção de proteínas estruturais, auxiliar no transporte de proteínas através da membrana, degradação de proteínas instáveis e remodelamento de proteínas desnaturadas (Johnson e Fleshner, 2006).

As HSPs são agrupadas em famílias de acordo com sua massa molecular (kDa), entre 8 e 110 kDa. A família mais conservada filogeneticamente é a família das HSPs de 70 kDa, representada pelas formas constitutiva de 73 kDa (HSP73) e induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72) (Chen et al., 2005).

As proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) são sintetizadas pelas células sob condições fisiológicas e de forma mais acentuada em condições de estresse. Pode-se considerar que a indução da expressão HSP70, com consequente elevação do conteúdo intracelular desta proteína, representa um potencial fator citoprotetor e, por extensão, protetor do organismo. Células que sintetizam HSP, como resposta à exposição ao estresse, encontram-se mais protegidas contra novas exposições, o que reflete menores lesões no organismo ou em parte dele (Meyer, 1999; Chung, 2008).

A ação anti-inflamatória da HSP70 está associada ao seu efeito inibitório sobre a ativação e a translocação do fator de transcrição nuclear conhecido como fator nuclear κ-B (NF-κB) (Homem De Bittencourt et al., 2007; Heck, 2011). O processo inflamatório está presente nas doenças metabólicas como obesidade, assim, pode-se dizer que a HSP70 pode exercer papel citoprotetor contra o desenvolvimento deste tipo de doença e ainda ser considerada um potencial terapêutico (Heck et al., 2014b). Neste sentido, estudos demonstram que a expressão de HSP70 apresenta ação moduladora da resposta imune (Johnson e Fleshner, 2006) em condições de doenças crônicas como diabetes, obesidade e resistência insulínica (Chung et al., 2008; Rodrigues-Krause et al., 2012).

A relação entre exposição ao $MP_{2,5}$, estresse oxidativo, inflamação e HSP70 resulta em síntese aumentada desta proteína pelo epitélio pulmonar e demais tecidos, a qual pode atuar como biomarcador do dano oxidativo (Ramage e Guy, 2004; Golli-Bennour e Bacha, 2011; Nakhjavani et al., 2010; Dubowsky et al., 2006).

A exposição aguda ao MP_{10} causa aumento de HSP70 no parênquima pulmonar 24 horas após a exposição, sugerindo resposta compensatória inicial e proteção aos tecidos (Farina et al., 2013). Estudos de Kido et al. (2011) também mostram aumento da expressão de HSP70 em macrófagos pulmonares após exposições crônicas a doses de 200 $\mu g/m^3$ e 400 $\mu g/m^3$ de partículas da exaustão do diesel.

2. OBESIDADE E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Estudos afirmam que as pessoas obesas comumente possuem um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios, o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas (França et al., 2013). Além disso, apresentam baixa atividade de enzimas citoprotetoras, tendo como consequência o dano celular progressivo e consequente estresse oxidativo (Vincent et al., 2007).

Em modelos de obesidade induzida por dietas hiperlipídicas ocorre o aumento de tecido adiposo e este, por sua vez, é fonte de mediadores pró-inflamatórios e adipocitocinas, as quais podem conduzir a ativação da inflamação e o estresse oxidativo no pulmão (Jung et al., 2013). Existe uma relação direta entre o acúmulo de gordura nos adipócitos e o aumento de estresse oxidativo, indicando que os adipócitos estimulam a produção de ERO por processos de fosforilação oxidativa, via NADPH oxidase, bem como, a produção exacerbada de ERO diminui a capacidade antioxidante (Furukawa et al., 2004).

As defesas antioxidantes prejudicadas, devido à exposição a poluentes e a condição de obesidade, podem desencadear uma série de sinalizações do estado redox no pulmão, as quais agem como biomarcadores (Kelly, 2003). Um sinal comum em virtude da exposição à poluição é o fluxo de células inflamatórias para o pulmão, o que aumenta a geração de radicais livres, desequilíbrio de enzimas antioxidantes e, por conseguinte, o estresse oxidativo. Do mesmo modo, os lipídios podem levar a ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear kB (NF-kB) e aumento de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias. Estas moléculas de sinalização podem ser consideradas como

sinais de alerta para o organismo, sendo que o pulmão é o órgão primário da lesão oxidativa (Kelly, 2003).

Neste sentido, as partículas inaladas podem depositar-se nas vias aéreas e interferir com os mecanismos de limpeza do pulmão ou depositar-se no pulmão profundo e eventualmente contribuir para o desenvolvimento da inflamação pulmonar, com consequente desenvolvimento de doenças respiratórias, como enfisema pulmonar e/ou câncer de pulmão (Gomes, 2002).

Em estudos experimentais, os autores Gurgueira et al. (2002) afirmam que ocorre alterações no sistema de defesa antioxidante enzimático após inalação de concentrado de partículas do ambiente (*concentrated ambient particles* – CPA), demostrando aumento da atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no pulmão. Além disso, os mesmos autores afirmam que esta adaptação enzimática é tecido específica, de modo que no pulmão ocorreu maior nível de indução (70 %) a isoforma mitocondrial da SOD (MnSOD), a isoforma citosólica (Cu/ZnSOD) mostrou-se inalterada e a CAT foi aumentada em 30% (Gurgueira et al., 2002).

Também ocorre a participação dos sistemas simpático e parassimpático na gênese de ERO geradas pela inalação de MP (Rhoden et al., 2005) sendo que o tratamento com antioxidante como o N-acetilcisteína é capaz de prevenir o dano pulmonar causado por exposição de cinco horas a concentrado de partículas, o que indica a participação de mecanismos oxidativos induzidos por MP (Rhoden et al., 2004), sendo que o processo inflamatório pulmonar é mediado pela ação do radical superóxido em exposições agudas a partículas urbanas (*Urban air particles* – UAP) (Rhoden et al., 2008). O superóxido é um potente indutor da produção de ERO e da liberação de citocinas pró-inflamatórias na circulação (Nogueira, 2009; Lodovici; Bigagli, 2011). Portanto, o aumento da produção de ERO aliado à menor atividade das enzimas antioxidantes são os principais responsáveis pelo processo central de estresse oxidativo no pulmão exposto a partículas tóxicas (Li et al., 2013).

Associado a estes fatores, ocorre o aumento de HSP70 no parênquima pulmonar (Farina et al., 2013) e macrófagos pulmonares (Kido et al., 2011) de camundongos expostos a poluentes do ar, o que sugere um resposta compensatória e proteção aos tecidos, podendo ser um importante mediador imunológico o que contribui para outros agravantes (disfunção vascular e

eventos cardiovasculares), induzidos pela exposição crônica à poluição do ar (Kido et al., 2011). A expressão de HSP70 pode ser considerada como um sinal de alerta, sendo uma resposta inicial de compensação ao estresse oxidativo (Heck et al., 2012).

Estudos demonstram forte associação entre obesidade e poluição atmosférica com prejuízos à saúde. Nesta associação, o ($MP_{2,5}$) induz produção acelerada de ERO com consequente estresse oxidativo e inflamação. Este quadro leva a intolerância à glicose e disfunção mitocondrial, oxidação do DNA, peroxidação lipídica e falência das células β do pâncreas, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de DM2 (O'neill et al., 2005; Pearson et al., 2010; Xu et al., 2010).

A associação do consumo de dietas hiperlipídicas e exposição ao $MP_{2,5}$ induz ao estresse celular, o que é demonstrado através da expressão de proteínas do choque térmico, as quais desempenham um papel fundamental de citoproteção em diferentes tipos de transtornos (De Maio, 2011). Obesidade e poluição produzem um ciclo vicioso de estresse oxidativo, o que conduz a perda do equilíbrio homeostático e produz efeitos sobre a expressão de HSP70. A exposição ao $MP_{2,5}$ leva a um quadro pró-oxidativo, resultando na síntese aumentada de HSP70 pelo epitélio pulmonar e demais tecidos, podendo sinalizar o dano oxidativo, atuando como um biomarcador (Ramage e Guy, 2004; Golli-Bennour e Bacha, 2011; Nakhjavani et al., 2010; Dubowsky et al., 2006).

Modelos experimentais em camundongos de exposição crônica a dietas hiperlipídicas e exposição ao $MP_{2.5}$ em câmaras ou instilação intratraqueal, provocam resistência à insulina local e sistêmica, intolerância à glicose e estresse oxidativo (Xu et al., 2010; Yan et al., 2011). Os autores Xu et al. (2010) afirmam que ocorrem alterações metabólicas nos animais submetidos a esta associação, devido a um quadro pró-inflamatório e pró-oxidativo. Sun et al. (2009) expuseram camundongos a dietas hiperlipídicas com teor de gordura acima de 40% e ao $MP_{2,5}$ em câmaras de exposição e afirmam que a associação causa aumento do tecido adiposo visceral, hiperglicemia de jejum, resistência a insulina e aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumorar (TNF-α) e inteleucina-6 (IL-6) no plasma, sendo que a

expressão da interleucina-10 (IL-10), considerada anti-inflamatória, foi reprimida pela associação.

Afirma-se que a exposição ao $MP_{2,5}$ associada ao consumo de alto níveis de lipídios prejudica a homeostase da glicose e da insulina, causando quadro de inflamação crônica, fornecendo evidências para uma interação importante entre os fatores ambientais e dietéticos (Sun et al., 2009).

Neste sentido, Goettems-Fiorin et al. (2014) afirma que o consumo de dieta rica em gordura associado à exposição ao $MP_{2,5}$ promove maior adiposidade em camundongos e menor capacidade de controle glicêmico. Além disso, estes animais apresentaram redução da massa pancreática e redução da expressão de HSP70 no pâncreas. Os mesmos autores demonstraram ainda que a associação entre obesidade e poluição por $MP_{2,5}$ causa alterações na capacidade antioxidante em tecidos metabólicos, como o aumento das enzimas SOD e CAT no tecido adiposo, aumento da CAT sem alteração da SOD no pâncreas e aumento da SOD e diminuição da CAT no fígado, evidenciado desbalanço antioxidante e estresse oxidativo sistêmico. O órgão-chave neste processo parece ser desconhecido, podendo ser associado ao tecido adiposo (Sun et al., 2009; Jung et al., 2013; Goettems-Fiorin, 2014), o qual pode conduzir a ativação de fatores pró-oxidativos até o pulmão e iniciar o processo de estresse oxidativo sistêmico (Li et al., 2013).

No entanto, os mecanismos fisiopatológicos da associação entre obesidade e exposição ao $MP_{2,5}$ não estão completamente elucidados. O presente estudo pretende investigar o processo de estresse oxidativo e da defesa antioxidante enzimática pulmonar, em condições de exposição crônica a baixas doses de partículas finas, por meio da instilação via intranasal de suspensão de $MP_{2,5}$ (Zanchi et al., 2008; Rivero et al., 2005) e obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica (Hariri e Thibault, 2010; Winzell e Ahrén, 2004; Buettner et al., 2007), considerando como base trabalhos semelhantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da associação entre o consumo de dieta hiperlipídica e a exposição crônica ao $MP_{2,5}$ em parâmetros de estresse oxidativo em pulmões de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da associação entre consumo de dieta hiperlipídica e exposição a material particulado fino no tecido pulmonar quanto a:

a) Peroxidação lipídica;

b) Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD);

c) Atividade da enzima Catalase (CAT);

d) Dano oxidativo proteico;

e) Determinação de grupo sulfidril total;

f) Expressão de HSP70.

4. REFERÊNCIAS

Astrup A, Ryan L, Grunwald GK, Storgaard M, Saris W, Melanson E, Hill JO. 2000. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. *Br J Nutr* 83:S25-S32.

Augusto O. 2006. Radicais Livres: Bons, maus e naturais. 1. ed. São Paulo: *Oficina de Textos*, 1:115p.

Augusto O, Miyamoto S. 2011. Oxygen radicals and related species. In: Pantopoulos K; Schipper H. (Org.). Principles of Free Radical Biomedicine: Nova Publishers, *Inc* 1:19-41.

Ballester F, Medina S, Boldo E, Goodman P, Neuberger M, Iñiguez C, Künzli N. 2008. Reducing ambient levels of fine particulates could substantially improve health: a mortality impact assessment for 26 European cities. J. Epidemiol. *Community Health* 62(2):98-105.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* 23(4):629-643.

Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Toxicol Enviromen Mutag* 415(3):167-184.

Bianchi MLP, Antunes LMG. 1999. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Rev Nutr* 12(2):123-130.

Boulden BM, Widder JD, ALLEN JC, Smith DA, Al-Baldawi RN, Harrison DG, Dikalov SI, Jo H, Dudley Jr. SC. 2006. Early determinants of H2O2 induced endothelial sydfunction. *Free Radic Biol Med* 41(5):810-7.

Braga ALF, Pereira LAA, Procópio M, André PA, Saldiva PHJr, 2007. Associação entre poluição atmosférica e doenças respiratórias e cardiovasculares na cidade de Itabira, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública RJ* 23(4):S570-S578.

Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook Jr, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith Jr, S, Whitsel L, Kaufman JD. 2010. Particulate matter air pollution and

cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121(21):2331-78.

Brunekreef B, Holgate ST. 2002. Air pollution and health. *The Lancet* 60:1233-1242.

Buege JA, Aust, SD. 1978. Microssomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-309.

Buettner R, Schölmerich J, Bollhheimer LC. 2007. High fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15(4):798-808.

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. 2002. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:834-842.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet–Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57:1470–1481

Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro AN. 2005. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86(6):627-637.

Chung J, Nhuyen AK, Henstridge DC, Holmes SG, Chan MH, et al. 2008. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(5):1739-44.

Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PHN, Oliveira ATD, Rhoden CR. 2012. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicol Mech Methods* 22(7):533–539.

De Maio A. 2011. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress and Chaperones* 16(3):235-249.

Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. 2006. Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. *JAMA* 295:1127-1134.

Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Wu ZX, Barger MW, Roberts Jr, Antonini JM, Dey RD, Ma JK. 2005. Effetcs of diesel exhaust particles on allergic

reactions and airway resnsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxocol Sci* 88(1):202-12.

Dubowsky SD, Suh H, Schwartz J, Coull BA, Gold DR. 2006. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environ Health Perspect* 114(7):992–998.

Emmerechts J, Hoylaerts MF. 2012. Air pollution and hemostasis. *Hamostaseologie* 32(1):5-13.

Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <http://www.epa.gov/>

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller NCM. 2004. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20(2):218-24.

Farina F, Sancini G, Battaglia C, Tinaglia V, Mantecca P, Camatini M, Palestini P. 2013. Milano Summer Particulate Matter (PM10) Triggers Lung Inflammation and Extra Pulmonary Adverse Events in Mice. *PLOS ONE* 8(2):e56636.

Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 43(1):61-68.

Ferro CO, Chagas VLA, Oliveira MF, Oliveira PL, Schanaider A. 2010. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. *Rev Col Bras Cir* 37(1):031-038.

Fraloub JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. 2010. A mouse model of metebolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in c57bl/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 46(3):1-12.

França BK, Alvesb MRM, Soutoa FMS, Tizianea L, Boaventurab RF, Guimarães A, Alves Jr A. 2013. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE J Port Gastrenterol* http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752–61.

Giannerini F, Giustarini D, Lusini L, Rossi R, Simplicio P. 2001. Responses of thiols to an oxidant challenge: differences between blood and tissues in the rat. *Chem Biol Interact* 134:73-85.

Goettems-Fiorin PB, Salamoni B, Baldissera FG, Santos AB, Homem De Bittencourt PIJr, Ludwig MS, Rhoden CR, Heck TG. 2014. Long-term exposure to particulate matter worsens metabolic dysfunction induced by high fat diet in mice. *Inhal Toxicol* "no prelo".

Goldberg MS, Burnett RT, Yale J, Valois M, Brooke JR. 2006. Associations between ambient air pollution and daily mortality among persons with diabetes and cardiovascular disease. *Environ Res* 100:255–267.

Golli-Bennour EE, Bacha H. 2011. HSP70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology* 287:1-7.

Gomes MJM. 2002. Ambiente e Pulmão. *J Bras Pneumol* 28(5):261-269.

Gurgueira SA; Lawrence J; Coull B; Murthy GGK; González-Flecha B. 2002. Rapid Increases in the Steady-State Concentration of Reactive Oxygen Species in the Lungs and Heart after Particulate Air Pollution Inhalation. *Environ Health Perspect* 110(8): 749-755.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine.3 ed. New York: Oxford University Press.

Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews* 23(2):270-299.

Heck TG. 2011. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 154 p.

Heck TG, Pizzato S, Ludwig MS, De Bittencourt Jr. PIH. 2012. Role of Heat Shock Proteins in Skeletal Muscle. In: Julianna Cseri. (Org.). *Skeletal Muscle* - InTech Open Access Company 1ed.:1-18.

Heck TG, Nunes RB, Petry MR, Maslinkiewicz A, Saldiva PHN, Dal Lago P, Rhoden CR. 2014a. Residual Oil Fly Ash (ROFA) Inhalation Promotes Lung and Heart Oxidative Stress without Hemodynamic Effects in Exercising Rats. *J Exerc Physiol Online* 17(1):78-89.

Heck TG, Salamoni B, Ludwig MS. 2014b. Proteínas do Choque Térmico: Implicações nas Doenças Crônicas não Transmissíveis. In:Winkelmann ER, Berlezi EM (Org.) *Atenção Integral à Saúde* 1ed.:165-183.

Henderson B. 2010. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct* 28(1):1-14.

Ho E, Karimi-Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 1(1):483–491.

Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. 2014. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 19(4):447-64.

Homem De Bittencourt PIJr, Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AM, Baldissera LP, Janner DR, Peralta JS, Bock PM, Gutierrez LL, Scola G,Heck TG, Krause MS, Cruz LA, Abdalla DS, Lagranha CJ, Lima T, Curi R. 2007. LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 193(2):245-258.

International Association for the Study of Obesity (IASO). About Obesity. Atualizado em: 03 de setembro de 2012. Disponível em: < http://www.iaso.org/resources/aboutobesity/>

Johnson JD, Fleshner M. 2006. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 79(3):425-34.

Jones RL, Nzekwu MM. 2006. The effects of body mass index on lung volumes. Chest 130(3):827-33.

Jordão AAJr, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. 1998. Peroxidação Lipídica e Etanol: Papel da Glutationa Reduzida e da Vitamina E. Medicina, 31:434-449.

Jordan, M. 2012. Oxidative stress: What is oxidative stress? Printed in the United States of America.

Jung, SH. 2013. Effects of Diet-Induced Mild Obesity on Airway Hyperreactivity and Lung Inflammation in Mice. *Yonsei Med J* 54(6):1430-1437

Kelly FJ. 2003. Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. Occup Environ Med 60:612–616.

Kido T, Bai N, Yatera K, Suzuki H, Meredith A, Mukae H, Rosenfeld ME, van Eeden SF. 2011. Diesel exhaust inhalation induces heat shock protein 70 expression in vivo. *Inhal Toxicol* 23(10):593-601.

Koenig SM, 2001. Pulmonary complications of obesity. Am J Med Sci 321(4):249-79.

Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Cokkinos DV. 2005. Pathophysiology of dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Postgrad Med* 81(956):358-366.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, 2008. Patologia Básica. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Li B, Jang J, Huang Q, Zhang Y, Peng C, Zhang Y, He Y, Shi J, Li W, Hu J, C Fan C. 2013. Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. *NPG Asia Materials* 1-8.

Littleton SW. 2012. Impact of obesity on respiratory function. Respirology 17:43–49.

Lodovici M, Bigagli E. 2011. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *J Toxicol* 2011:9p.

Martinelli N, Olivieri O, Girelliet D. 2013. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review. *Eur J Intern Med* 24:295–302.

Meyer, TN. 1999. Resposta celular ao estresse. *Rev Ass Med Brasil* 45(2):181-188.

Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, Macnee W, Cassee FR, Sandstrom T, Blomberg A, Newby DE. 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6(1):36-44.

Morimoto R, A. Tissieres, et al. 1990. Stress Proteins in Biology and Medicine. New York: Cold Spring Harbor. 450 p. (Monograph Series).

Mota MP, Figueiredo PA, Duarte JA. 2004. Teorias biológicas do envelhecimento. *Rev Port Cien Desporto* 4(1):81-110.

Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, Esteghamati A, Khalilzadeh O, Asgarani F, Outeiro TF. 2010. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress and Chaperones* 15(6):959-964.

Nogueira JB. 2009. Poluição atmosférica e doenças cardiovasculares. *Rev Port Cardiol* 28(6):715-733.

O'Neill MS, Veves A, Zanobetti A, Sarnat JA, Gold DR, Economides PA, Horton ES, Schwartz J. 2005. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation* 111(22):2913–2920.

Olszewer E, 1992. Radicais livres em Medicina. Editora Fundo BYD. 122p.

Organização Mundial da Saúde (OMS). 2014. Disponível em: http://www.who.int/en/

Pearson JF, Bachireddy C, Shyamprasad S, Goldfine AB, Rownstein JS. 2010. Association Between Fine Particulate Matter and Diabetes Prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 33(10):2196-2201.

Pereira CE, Heck TG, Saldiva PH, Rhoden CR. 2007. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res* 40(10):1353-1359.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PCL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 30:848-853.

Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K. Thurston GD. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 287(9):1132-1141.

Pope III CA, Dockery DW. 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 56:709-742.

Ramage L, Guy K. 2004. Expression of C-Reactive Protein and Heat-Shock Protein-70 in the Lung Epithelial Cell Line A549, in Response to PM10 Exposure. Inhal Toxicol 16(6-7):447-452.

Reich B J, Fuentes M, Burke J. 2008. Analysis of the effects of ultrafine particulate matter while accounting for human exposure. *Environmetrics* 20(2):131-146.

Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, González-Flecha B. 2004. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sci* 79:296–303.

Rhoden, C. R., Wellenius, G., Ghelfi, E., Lawrence, J., and Gonzalez-Flecha, B. 2005. PM-Induced cardiac oxidative stress is mediated by autonomic stimulation. *Biochem Biophys Acta* 1725:305–313.

Rhoden CR, Ghelfi E, González-Flecha B. 2008. Pulmonary inflammation by ambient air particles is mediated by superoxide anion. *Inhal Toxicol* 20:11–15.

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, dolhnikoff M, Saldiva PH. 2005. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci* 85(2):898-905.

Robert, J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol* 27:449–464.

Roberts CK, Barnard RJ. 2005. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol* 98(1):3-30.

Rodrigues-Krause J, Krause M, O'hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P, Colleran G. 2012. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293–302.

Rosini TC, Silva ASR DA, Moraes, C. 2012. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras* 58(3):383-387.

Sharma A, Bernatchez P, Haan JB. 2011. Targeting Endothelial Dysfunction in Vascular Complications Associated with Diabetes. *Int J Vascular Med* 2012:750126.

Schuster D. 2010. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Diabetes Metab Syndr Obes* 3:253–262.

Sun Q, Yue P, Deiuliis JA, Lumeng CN, Kampfrath T, Mikolaj MB, et al. 2009. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity. *Circulation* 119(4):538-46.

Suzuki YJ, Carini M, Butterfield AD, 2010. Protein Carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12(3):323-325.

Tong H, Cheng WY, Samet JM, Gilmour MI, Devlin RB. 2010. Differential Cardiopulmonary Effects of Size-Fractionated Ambient Particulate Matter in Mice. *Cardiovasc Toxicol* 10:259–267.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS. 2007. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores

de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. *Quim Nova* 30(5):1323-1338.

Vincent HK, Powers DK, Dirks AJ, Scarpace PJ. 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes (Lond)* 25:378-388.

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. 2007. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9(6):813-839.

Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115(5):1111–9.

West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. 1992. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *AJP – Regu Phyisiol* 262:R1025-32.

White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, R. Neto JM, et al. 2013. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab* 57(5):339-345.

Winzell MS, Ahrén B. 2004. The hig-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(3):S215-9.

Xu X, Yavar Z, Verdin M, Ying Z, Mihai G, Kampfrath T, et al. 2010. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice: role of p47phox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12):2518-27.

Yan LJ, Traber MG, Packer L. 1995. Spectrophotometric Method for Determination of Carbonyls in Oxidatively Modified Apolipoprotein B of Human Low-Density Lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349-351.

Yin F, Lawal A, Ricks J, Fox Jr, Larson T, Navab M, Fogelman AM, Rosenfeld ME, Araujo JA. 2013. Diesel Exhaust Induces Systemic Lipid Peroxidation and Development of Dysfunctional Pro-Oxidant and Pro-Inflammatory High-Density Lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(6):1153-61.

Zanchi AC, Venturini CD, Saiki M, Saldiva PHN, Barros HMT, Rhoden CR. 2008. Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. *Inhal Toxicol* 20(9):795–800.

Zanobetti A, Canner MJ, Stone PH, Schwartz J, Sher D, Eagan-Bengston E, Gates KA, et al. 2004. Ambient Pollution and Blood Pressure in Cardiac Rehabilitation Patients. *Circulation* 110(15):2184-2189.

5. ARTIGO

Periódico internacional: ***Inhalation Toxicology (2.34)***

Long-term exposure to fine particulate matter modify enzymatic antioxidant defense in the lung of mice fed high fat diet

Bethânia Salamoni Grochanke[1,2], Pauline Brendler Goettems Fiorin[1,2], Fernanda Giesel Baldissera[1,2], Eloisa Gabriela de Pelegrin Basso[1], Mirna Stela Ludwig[1,3], Claudia Ramos Rhoden[2], and Thiago Gomes Heck[1,3]

[1]Research Group in Physiology. Department of Life Sciences, Regional University of Northwestern State's Rio Grande do Sul (UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil.

[2]Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution, Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

[3]Postgraduation Program in Integral Attention to Health (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brazil.

Adress for Correspondence:

Bethânia Salamoni - Department of Life Sciences, Regional University of Northwestern State's Rio Grande do Sul

Rua Do Comércio, 3000 – Bairro Universitário, Ijuí-RS. Brazil.

ZIP code: 98700-000.

Phone: +55 (55) 3332-0476

e-mail: bhesalamoni@hotmail.com

Running title: $MP_{2.5}$ modify enzymatic antioxidant defense in the lung

Acknowledgements

The authors would like to thank to AB dos Santos, ETC Martins, MM Sulzbacher, RDB Basso, L Pereira (all from UNIJUI), PHN Saldiva (USP) and colleagues from the Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution (UFCSPA) for their technical support.

Financial support

This work was supported by Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) and by grants from The State Rio Grande do Sul Foundation for Research Support (PqG-2013 - FAPERGS, process: 002106-2551/13-5 to TGH). PBGF and FGB were recipients of scholarships from the *Coordination* for the *Improvement of Higher Education Personnel* (CAPES).

Competing financial interests

The authors declare that they do not have competing financial interests.

Abstract

Air pollution by fine particulate matter ($PM_{2.5}$) is a public health problem that increases a risk to pulmonary diseases. Individuals with pre-existing metabolic changes when exposed to $PM_{2.5}$ may be predisposed to develop pro-oxidative profile and thus requires more activation of enzymatic antioxidant defense system. $PM_{2.5.}$ can exacerbate the metabolic changes in animal model of high fat diet. However, no data was found about the effect of long-term exposure to $PM_{2.5}$ in oxidative stress parameters in lungs in a pre-treated HFD animal. Male mice (n = 55) were fed with standard or high fat diet (HFD) for 12 weeks. After the diet protocol they were randomly exposed to daily intranasal instillation of saline or $PM_{2.5}$ solution for subsequent 12 weeks, divided into four groups: Control, $PM_{2.5}$, HFD and HFD+$PM_{2.5}$. The association HDF+$PM_{2.5}$ increased SOD enzyme activity (43% compared to Control), the SOD/CAT ratio (36% compared to Control) and protein damage (25% compared to Control) in the lungs, demonstrating that consumption of HFD increase susceptibility of oxidative stress induced by levels of fine particulate matter. Long-term exposure

to $PM_{2.5}$ modify enzymatic antioxidant defense and promotes protein oxidative damage in the lung of animals that fed HFD, providing evidence for an important interaction between environmental and dietary factors for lung diseases.
Keywords: oxidative stress, particulate matter; obesity, lung.

Introduction

The $PM_{2.5}$ inhalation induces lung oxidative stress damage due to the generation of ROS in amounts that can exceed the pulmonary antioxidant capacity (Valavanidis et al., 2013). Antioxidant enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) act in cooperation against oxidative insult induced by $PM_{2.5}$ (Zanchi et al., 2008; Lobo et al., 2010), eliminating excessive ROS and participate of the physiological adaptations in injured lung tissue (Barbosa et al., 2010; Lobo et al., 2010). Since a part of lung oxidative stress induced by $PM_{2.5}$ inhalation is mediated by the action of superoxide anion (Rhoden et al., 2008), the main substrate of SOD, the modulation of SOD and CAT activities represents antioxidant exigency after $PM_{2.5}$ exposure (Gurgueira et al., 2002; Damiani et al., 2012). This oxidative unbalance induced by $PM_{2.5}$ inhalation can be accompanied by the increase expression of stress proteins as 70kDa heat shock proteins (HSP70) in bronchoalveolar lavage of mice acutely exposed to particles (Farina et al., 2013). Also, the increase of HSP70 expression in the lung parenchyma (Farina et al., 2013) and pulmonary macrophages (Kido et al., 2011) suggest an activation of the stress response and a requirement of the cell protection mechanism of the lung tissues against air pollutant aggression.

Individuals with metabolic dysfunctions are predisposed to develop higher pro-oxidative profile, since they have increased production of reactive

oxygen species such as superoxide anion and hydrogen peroxide (Goldberg et al., 2006; Sharma et al., 2011). Human and experimental studies showed that are present the oxidative stress and a decrease in HSP70 expression in tissues in advanced obesity (Di Naso et al., 2014, Gupte et al., 2009; Hooper et al., 2014). Our recent work showed that the association of high fat diet (HFD) plus fine particulate matter ($PM_{2.5}$) worsen metabolic profile in mice, and this effect is related to altered expression of HSP70 and activity of CAT and SOD in metabolic related tissues (liver, muscle, pancreas and white adipose tissue) (Goettems-Fiorin et al., 2014). The combination HFD+$PM_{2.5}$ promotes different tissue responses against HFD+$PM_{2.5}$ exposure, the adiposity can compress the thorax which damages lung function (Koenig, 2006). However, in the work of Goettems-Fiorin et al. (2014) was not evaluated the lung oxidative stress parameters or HSP70 expression.

The aim of our study was evaluated the oxidative stress parameters and HSP70 expression in the lung of mice in response to combination of these two factors, the chronic intake of HFD and chronic exposure to $PM_{2.5}$.

Methods

Animals

Male (n=55) just-weaned 21 days old B6129SF2/J mice (approximately 14 g), from Animal Facility of Regional University of Northwestern State´s Rio Grande do Sul were kept in semi-metabolic cages, under controlled conditions of temperature (22 ± 2ºC), relative humidity (50% - 60%) and light-dark cycles (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). The animals received water *ad libitum*. This

protocol was approved by the Animal Ethics Committee of UNIJUÍ (CEUA 009/13).

Experimental design

The mice were randomly divided into four groups: Control (n=14), $PM_{2.5}$ (n=13), HFD (n=14) and HFD+$PM_{2.5}$ (n=14). Animals in Control and $PM_{2.5}$ groups received standard diet (4% calories from fat) and animals from HFD and HFD+$PM_{2.5}$ groups received HFD (60% energy from fat) for 24 weeks. At 12th week, $PM_{2.5}$ and HFD+$PM_{2.5}$ groups received intranasal instillation of $PM_{2.5}$ (5µg/10µL) daily, while Control or HFD groups received saline solution, for the subsequent 12 weeks (up to 24 weeks) (Goettems-Fiorin et al., 2014).

Diet

The standard diet (Nuvilab CR-1) (4% energy from fat) consisted of crude protein, mineral material, fibrous matter and minerals. The HFD (60% calories from fat) was composed by (w/w) 40.4% of standard diet (Nuvilab CR-1), 37.4% of lard, 13.7% of egg albumin, 7.4% of amino acid supplement Aminomix$^{(TM)}$ and 1.1% of a flour of dried bone and oyster, prepared once a week in our laboratory. The animals received standard diet or HFD for 24 weeks. HFD preparation adapted from previous work (Winzell and Ahre´n, 2004).

Characterization of Particulate Matter

The pollutant used in the experiment was $PM_{2.5,}$ contained in polycarbonate filter, which was collected through a gravimetric collector, on the terrace of the Faculty of Medicine, University of São Paulo (USP) in São Paulo, Brazil (as

described in Maatz et al., 2009). Briefly, after exposure to urban air pollution (24 h), the filter was removed and retained particles were obtained by sonication, with ultrasound bath in seven sessions (50 min) resuspended in saline solution at a dose of 5 µg/10 µL. The process of intranasal instillation was performed daily, once a day (at 1:00 and 2:00 p.m.), for 12 weeks with an automatic pipette, with 10µL of solution in the nostril of the animal, this induces apnea reflex promoting the inhalation of the pollutant.

Body weight, Glucose, Triglycerides, Total Cholesterol

Body weight, glycaemia, triglycerides and cholesterol were measured before the experiment (basal), on the 12^{th} and 24^{th} week. The body weight (g) was checked with semi-analytical scale. Glycaemia was measured by Glucometer Optium Xceed (Abbott) (5 µL of blood) and the triglycerides and total cholesterol levels was assessed with Accutrend ® Plus System (Roche) (25 µL of blood) in a puncture of the distal part of the tail of mice. The results were expressed in mg/dL of blood.

Oxidative Stress

Tissue Preparation

At the end of the 24 weeks of intervention, the animals were euthanized by decapitation. Lungs were dissected, weighed, frozen in liquid nitrogen with *freeze clamp* and stored for further homogenization.

For analysis of oxidative stress parameters, a portion of the tissues was homogenized in 5 volumes of potassium phosphate buffer pH 7.4 containing protease inhibitor cocktail: leupeptin (2 µg/mL = 4.2 µM), aprotinin (2 µg/mL =

0.31 μM), TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride, 0.74 μg/mL = 20 μM) and PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, 17.42 μg/mL = 100 μM). To determine the HSP70 expression by Western blotting, another portion of the lung were homogenized in 0.1% (w/v) SDS buffer containing protease inhibitor cocktail, consisting of leupeptin (4.2 μM), aprotinin (0.31 μM), TLCK (20 μM) and PMSF (100 μM).

Protein Concentration

The protein concentration in tissues was determined by the spectrophotometric method of Bradford (1976) at 595 nm, using bovine serum albumin as standard (points from 0.04 – 3.0 mg/mL).

Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was analyzed using TBARS method (Buege; Aust 1978). Homogenates were precipitated with 10% trichloroacetic acid, centrifuged, and incubated with thiobarbituric acid for 15 min at 100 °C. Afterwards, the absorbance was recorded by spectrophotometry at 535 nm. The MDA standard was prepared from 1.1.3.3-Tetramethoxypropane (points from 0.0005 – 0.016 mg/mL). Results were expressed in nmol MDA/mg of protein.

SOD and CAT Activity

SOD activity was performed by inhibition of auto-oxidation of pyrogallol (Marklund; Marklund 1974). In a cuvette, 930 µl of 50 mM Tris/ 1mM EDTA Buffer (pH 8.2), 4 µl of catalase (CAT; 30 µM) and 50 µl of homogenate were added and mixed. After, pyrogallol (24 mM in HCl 10 mM) was added and SOD

activity determined at 25 C in spectrophotometer (420 nm) for 120 s. Results were expressed in Unit SOD/mg of protein.

CAT activity was performed accordingly to Aebi (1984). In a quartz cuvette, 30 µl of homogenate, 2865 µl of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) were mixed, and after, 105 µl of hydrogen peroxide (0.01 M) was added and mixed. The decomposition of hydrogen peroxide by CAT activity was determined at 25°C in spectrophotometer (240 nm) for 120 s. The results were expressed in pmol/mg of protein.

SOD/CAT ratio

The indicative ratio of oxidative stress, was calculated by the ([SOD]/[CAT]) ratio, the ratio between SOD and CAT activities enzymes may be more important in the evaluation of cellular antioxidant profile than the activity absolute levels of these enzymes individually (Pinho et al., 2006; Zanchi et al., 2010). The results were expressed in SOD/CAT arbitrary units, is the increase of tissue prevention and reduction factor is indicative of injury (Pinho et al., 2006).

Protein carbonyls

The protein oxidative damage was realized by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Yan et al., 1995). Homogenates were diluted in Tris-HCl Buffer 10nM (TRIS 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol, HCl hydrochloric acid, pH 7.4), after were incubated in DNPH for one hour at room temperature. The proteins were soon precipitated by the addition of 500µL denaturing buffer containing 3% SDS,

2000µL ethanol and 2000µL hexane, followed thorough stirring and centrifuged for 15 min in 3000rpm. The pellet is resuspended in denaturing buffer containing 3% SDS for 20 min at 40°C and carbonyls groups were determined in spectrophotometer (370 nm), using a molar extinction coefficient of 22,000 mol/L. Results were expressed in carbonyls groups µmol/L.

Determination of total sulfhydryl groups (T-SH)

The 5'5'dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) is reduced by thiols generating a yellow derivative (TNB) (Sedlak; Lindsay, 1968). The samples were homogenized in 20 volumes of EDTA buffer (0.02 M), after were incubated in 300µL Tris-HCl buffer (0.2 M pH 8.2), 20µL DTNB, 1580µL Methanol for 15 min at room temperature. Then the samples were centrifuged for 15 min at 4000rpm and sulfhydryl groups determined in spectrophotometer (412 nm), using a molar extinction coefficient of 13,100 mol/L. Results were expressed in µmol/L T-SH groups.

HSP70 Expression

The HSP70 expression was evaluated in lung by immunoblot analyses (Kolberg et al., 2006). Equivalent amounts of protein from each sample (~ 40 µg) were prepared in sample buffer [Tris 50 mM, SDS 10%, glycerol 10%, 2-mercaptoethanol 10% and 2mg/ml bromphenol blue]. The samples were boiled for 5 min and electrophoresed in a 10% polyacrylamide gel (5h in 15 mA/gel). After, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE HealthCare) by electrotransfer (1h in 100 V) and subsequently, transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma-Aldrich).

The procedures were performed with SNAP i.d. (Merck Millipore), vacuum system for rapid immunoblot. Membranes were washed with water and then blocked in 0.5% (w/ v) nonfat dry milk in washing buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v); TEN is 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4]. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated for 15 min with monoclonal anti-HSP70 antibody (Sigma-Aldrich H5147, 1:1000). After three consecutive washings with wash buffer, peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich A9044) was utilized as secondary antibody, at 1:15000 dilution. As a gel loading control, was used anti β-actin containing peroxidase (Sigma-Aldrich A3854, dilution 1:15000). Blot visualization was performed using ECL-Prime Western blotting Reagent (GE Healthcare). Quantification of bands was performed using the Image J® software. The data are presented in arbitrary units HSP70, normalized in terms of β-actin.

Statistical analysis

Statistical analysis was developed using One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Post hoc multiple comparisons among groups were performed with the Tukey's test. All statistical analyses were carried using GraphPad InStat 3.0. The level of significance was set at 5%. Results were expressed as mean ± standard deviation.

Results

At the beginning of the experiment all of animals had similar body weight and after 12 weeks of consumption of the HFD there was an increase in the body weight in both HFD and HFD+$PM_{2.5}$. (P=0.0351; Table 1). The inhalation

of $PM_{2.5}$ between the 12^{th} and 24^{th} weeks did not modify the body weight. The HFD consumption, $PM_{2.5}$ instillation or both together did not promote modifications in the fast glycemia, triglycerides or total cholesterol concentration (Table 1). All metabolic profile of these animals was previous published in Goettems-Fiorin et al., 2014.

The treatments ($PM_{2.5}$, HFD and HFD+$PM_{2.5}$) did not modified lipid peroxidation levels (Figure 1A) or CAT activity (Figure 1B) in the lung homogenates. However, the consumption of HFD presented an increased by 27% SOD activity in lungs (HFD and HFD+$PM_{2.5}$ groups) ($P<0.01$ and $P<0.001$ respectively; Figure 1C) with higher by 42% lung SOD activity in the HFD+$PM_{2.5}$ group compared to Control. The combination of HFD and $PM_{2.5}$ results in the increased by 37% (compared to Control) on the SOD/CAT ratio ($p=0.002$; Figure 1D).

The HFD+$PM_{2.5}$ treatment promoted the increased by 25% protein carbonyls compared to Control ($p=0.028$; Figure 2A). However, there is not formation in sulfhydryl groups in any treatment ($PM_{2.5}$, HFD, HDF+$PM_{2.5}$) (Figure 2B) and did not occur changes in the Carbolys/SH ratio (Figure 2C). The HSP70 expression was not influenced by $PM_{2.5}$, HFD or both (Figure 2D).

Discussion

The SOD and CAT enzymes detoxify ROS produced in lung tissue and can be considered the first line of antioxidant defense in lungs. The association between the consumption of HFD and chronic exposure to $PM_{2.5}$ did not produce changes in CAT activity and MDA levels in the lungs but, caused an increased activity of SOD. The CAT enzyme can be inhibited by superoxide, if it

is not fully removed by the action of SOD (Halliwell; Gutteridge, 2007). The increased antioxidant activity of SOD without a proportional increase in CAT activity occurs, may indicate an overload of peroxides (Pinho et al., 2006; Rocha et al., 2010). The peroxides react with transition metals that can be presented in ambient particles and can generate hydroxyl radical that is extremely harmful to health and is considered the most reactive and damaging ROS. This radical reacts with the nearest cellular targets by not showing specificity causing failures in the transcription, that can be associated to protein oxidative damage (Halliwell; Gutteridge, 2007).

The increase in the ratio between SOD and CAT induced by the combination HFD+PM2.5 may represent a tissue response against oxidative stress (Sanders et al., 2004; Pinho et al., 2006; Rocha et al., 2010), that can be associated with no alteration in the levels of lung lipid peroxidation. In other hand, the decreasing of SOD/CAT ratio can be associated with tissue injury (Zanchi et al., 2010; Bambini-Junior et al., 2011; Sousa et al., 2014) and systemic inflammatory response (Rhoden et al., 2005). The enzyme glutathione peroxidase (GPx) may be playing an additional role of antioxidant protection in this tissue, prevent the accumulation of hydrogen peroxide and lipid peroxidation.

The formation of sulphydryl groups (SH) and the HSP70 expression represent cytoprotection mechanisms that were not able to prevent oxidative damage in proteins, as showed by increasing in lung carbonyl content in our study. The HSP70 and SH groups are synthesized for cells under physiological conditions and more markedly in conditions of stress. The expression of HSP70 has chaperone activity and is also overexpressed during cell stress situation

and is responsible for maintaining the cell integrity protein structure (De Maio, 2011). The HFD+$PM_{2.5}$ association lead to an increased in the protein oxidative damage that may result from the aggregation of proteins (Miwa et al., 2008). Acute exposed to PM_{10} induced and increase in the HSP70 expression in lung parenchyma, measured 24 hours after exposure, suggesting initial compensatory response and protection to lung tissue. Kido et al. (2011) study show an increased in the HSP70 expression in lung macrophages after chronic doses of the 200μg/m^3 and 400μg/m^3 DE (diesel exhaust) exposures, considered high when compared to our protocol. In our chronic study, we the levels of HSP70 were not modified in the lungs because the protocol characteristics (dose of 5μg intranasal administration and pollutant $PM_{2.5}$).

In the same way, our protocol can be considered low aggressive to cause an increase of MDA in the lungs. Accordingly, Gurgueira et al. (2002) 24 hours after exposure to concentrated particles the lungs are able to regain homeostatic balance, suggesting that the lungs can compensate transient increases in the levels of particles and therefore do not present alterations in lipid peroxidation (Gurgueira et al., 2002) in chronic models at low doses. Also, chronic exposure to higher doses as 500μg of ROFA, increased total cell count in bronchoalveolar lavage (BAL), without modification in MDA levels (Damiani et al., 2012). Finally, acute exposure to the superoxide radical, appears to be essential for the activation of inflammatory responses in the lung (Rhoden et al., 2008). On this fact, we suggest that the increased SOD activity is the main antioxidant defense mechanism to prevent oxidative damage in the animals' lungs treated with HFD+$PM_{2.5}$.

Animals receiving the HFD showed an unfavorable metabolic condition, and the consumption of HFD associated with exposure to PM2.5 (HFD+PM2.5 group) promoted greater adiposity and lower glycemic control (Goettems-Fiorin et al., 2014). The increase in adipose tissue compresses the thorax which decreases lung function (Koenig, 2006), in addition which is a source of pro-inflammatory mediators and adipocytokines, can be cause activation of the inflammation and oxidative stress in the lung (Jung et al., 2013; Li et al., 2013).)

The increased SOD activity in the lungs of mice that receiving HFD and HDF+$PM_{2.5}$, may be related to food intake and metabolism of fatty acids, which induces the increase of the superoxide radical genesis formed in the mitochondrial respiratory chain (Rosini et al., 2012), primarily responsible for the response activation inflammatory in the lung (França et al., 2013).

Tong et al. (2010) testing different particle sizes (coarse, fine and ultrafine) at a dose of 100μg and affirm that after 24 hours exposure, the coarse and fine particles cause damage to the animals respiratory system. However, in our study we noticed $PM_{2.5}$ at low daily doses (5μg) promotes protein oxidative damage in lungs from mice treated with HFD+$PM_{2.5.}$ Since HFD can inhibits HSP70 expression, the no increase in HSP70 content in lung can represent a leak of cytoprotection.

In this sense, enzymatic alteration caused by eating HFD and exposure to low doses of $PM_{2.5}$ may not result in visible clinical changes, but result in sub clinical effects as oxidative damage. The loss of equilibrium between the antioxidant activity of SOD and CAT enzymes can participates of the protein oxidative stress in the lung of mice exposed to HDF+$PM_{2.5}$.

Conclusion

The data presented in this study showed that the HFD associated with chronic exposure to doses of $PM_{2.5}$ induces oxidative damage to proteins and alter the enzymatic antioxidant defense equilibrium of lung, by increase the SOD activity. The increase in the SOD/CAT ratio, can be associated with a tissue protein oxidative damage induced by the concomitant exposure to HDF+$PM_{2.5}$.

REFERENCES

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121–126.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* 23(4):629-643.

Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. 2011. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res* 1408(23):8-16.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Buege JA, Aust SD. 1978. Microssomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 52:302-309.

Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PHN, Oliveira ATD de, Rhoden CR. 2012. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicol Mech Methods* 22(7):533-539.

De Maio A. 2011. Extracellular heat shock proteins cellular export vesicles and the stress observation system: A form of communication during injury infection and cell damage. *Cell Stress Chaperones* 16(3):235–249.

Di Naso FC, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt A, Marroni NAP, Homem De Bittencourt PIJr. 2014. Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring)* 22:1-10.

Farina F, Sancini G, Battaglia C, Tinaglia V, Mantecca P, Camatini M, Palestini P. 2013. Milano Summer Particulate Matter (PM10) Triggers Lung Inflammation and Extra Pulmonary Adverse Events in Mice. *PLoS One* 8(2):e56636.

França BK, Alvesb MRM, Soutoa FMS, Tizianea L, Boaventurab RF, Guimarães A, Alves Jr A. 2013. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. GE J Port Gastrenterol http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002.

Goettems-Fiorin PB, Salamoni B, Baldissera FG, Santos AB, Homem De Bittencourt PIJr, Ludwig MS, Rhoden CR, Heck TG. 2014. Long-term exposure to particulate matter worsens metabolic dysfunction induced by high fat diet in mice. Inhalation Toxicology. “no prelo”.

Goldberg MS, Burnett RT, Yale J, Valois M, Brooke JR. 2006. Associations between ambient air pollution and daily mortality among persons with diabetes and cardiovascular disease. *Environ Res* 100:255-267.

Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC.2009. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 58(3):567-578.

Gurgueira SA; Lawrence J; Coull B; Murthy GGK; González-Flecha B. 2002. Rapid Increases in the Steady-State Concentration of Reactive Oxygen Species in the Lungs and Heart after Particulate Air Pollution Inhalation. *Environ Health Perspect* 110(8): 749-755.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine.3 ed. New York: Oxford University Press.

Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. 2014. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 19(4):447-64.

Jung, SH. 2013. Effects of Diet-Induced Mild Obesity on Airway Hyperreactivity and Lung Inflammation in Mice. *Yonsei Med J* 54(6):1430-1437.

Kido T, Bai N, Yatera K, Suzuki H, Meredith A, Mukae H, Rosenfeld ME, van Eeden SF. 2011. Diesel exhaust inhalation induces heat shock protein 70 expression in vivo. *Inhal Toxicol* 23(10):593-601.

Kolberg A, ROSA TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, Lagranha DJ, Heck TG, Curi R, de Bittencourt PI Jr. 2006. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 24(1):23-39.

Koenig SM, 2001. Pulmonary complications of obesity. Am J Med Sci 321(4):249-79.

Li B, Jang J, Huang Q, Zhang Y, Peng C, Zhang Y, He Y, Shi J, Li W, Hu J, C Fan C. 2013. Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. NPG Asia Materials 1-8.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4(8):118–126.

Maatz LF, Wood GJ, Rivero DH, Saldiva PH. 2009. Tracheal instillation of urban PM(2.5) suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. *Braz J Med Biol Res* 42(2):207-13.

Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47(3):469–474.

Miwa S, Beckman KB, Muller FL. 2008. Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases. Humana Press.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PCL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 30:848-853.

Rhoden, C. R., Wellenius, G., Ghelfi, E., Lawrence, J., and Gonzalez-Flecha, B. 2005. PM-Induced cardiac oxidative stress is mediated by autonomic stimulation. *Biochem Biophys Acta* 1725:305–313.

Rhoden CR, Ghelfi E, González-Flecha B. 2008. Pulmonary inflammation by ambient air particles is mediated by superoxide anion. *Inhal Toxicol* 20:11–15.

Rocha da RF, de Oliveira MR, Pasquali MA, Andrades ME, Oliveira MW, Behr GA, Moreira JC. 2010. Vascular redox imbalance in rats submitted to chronic exercise. *Cell Biochem Funct* 28(3):190-196.

Rosini TC, Silva ASR DA, Moraes, C. 2012. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras*, 58(3):383-387.

Sanders LM, Henderson CE, Hong MY, Barhoumi R, Burghardt RC, Wang N, Spinka CM, Carroll RJ, Turner ND, Chapkin RS, Lupton JR. 2004. An

Increase in Reactive Oxygen Species by Dietary Fish Oil Coupled with the Attenuation of Antioxidant Defenses by Dietary Pectin Enhances Rat Colonocyte Apoptosis. *J Nutr* 134(12):3233-8.

Sharma A, Bernatchez P, Haan JB. 2011. Targeting Endothelial Dysfunction in Vascular Complications Associated with Diabetes. *Int J Vascular Med* 2012:750126.

Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem* 25:192-205.

Sousa de RT, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R. 2014. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res* 50:36-41.

Tong H, Cheng WY, Samet JM, Gilmour MI, Devlin RB. 2010. Differential Cardiopulmonary Effects of Size-Fractionated Ambient Particulate Matter in Mice. *Cardiovasc Toxicol* 10:259–267.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. 2013. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int J Environ Res Public Health* 10(9):3886-907.

Winzell MS, Ahrén B. 2004. The hig-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(3):S215-9.

Yan LJ, Traber MG, Packer L. 1995. Spectrophotometric Method for Determination of Carbonyls in Oxidatively Modified Apolipoprotein B of Human Low-Density Lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349-351.

Zanchi AC, Venturini CD, Saiki M, Saldiva PHN, Barros HMT, Rhoden CR. 2008. Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. *Inhal Toxicol* 20(9):795–800.

Zanchi AC, Saiki M, Saldiva PH, Barros HM, Rhoden CR. 2010. Hippocampus lipid peroxidation induced by residual oil fly ash intranasal instillation versus habituation to the open field. *Inhal Toxicol* 22(1):84-88.

Table 1. Body weight and blood biochemical parameters of mice before and after exposure to HFD and $PM_{2.5}$

	Basal		12 Week		24 Week	
	Mean ± SD	**P Value* F Value**	**Mean ± SD**	**P Value* F Value**	**Mean ± SD**	**P Value* F Value**
Body Weight (g)		0.2328 $F_{3;54} = 1.473$		**0.0351 $F_{3;54} = 3.090$**		0.3841 $F_{3;54} = 1.037$
Control	13.9 ± 2.8		27.6 ± 2.2		29.0 ± 2.4	
PM2.5	13.2 ± 2.3		27.5 ± 2.3		29.1 ± 2.4	
HFD	15.4 ± 2.9		29.5 ± 3.0*		29.4 ± 3.5	
HFD+PM2.5	13.9 ± 2.8		29.8 ± 2.5*		30.6 ± 2.6	
Glycemia (mg/dL)		0.3047 $F_{3;34} = 1.261$		0.8307 $F_{3;34} = 0.2921$		0.3868 $F_{3;34} = 1.044$
Control	79 ± 20.7		87 ± 11.4		99 ± 8.0	
PM2.5	98 ± 23.6		86 ± 12.5		111 ± 22.1	
HFD	86 ± 19.4		89 ± 20.4		112 ± 23.2	
HFD+PM2.5	92 ± 21.2		95 ± 35.1		109 ± 9.6	
Triglycerides (mg/dL)		0.7301 $F_{3;25} = 0.4351$		0.6733; $F_{3;25} = 0.5194$		0.1315 $F_{3;25} = 2.084$
Control	184 ± 109.6		181 ± 17.9		144 ± 18.5	
PM2.5	186 ± 98.2		190 ± 26.3		135 ± 27.1	
HFD	206 ± 69.6		211 ± 55.7		181 ± 47.2	
HFD+PM2.5	150 ± 65.4		198 ± 69.4		199 ± 91.1	
Total Cholesterol (mg/dL)		0.7967 $F_{3;25} = 0.3399$		0.2684 $F_{3;25} = 1.403$		0.6936 $F_{3;25} = 0.4891$
Control	162 ± 5.7		168 ± 3.9		170 ± 4.4	
PM2.5	157 ± 7.0		165 ± 1.8		168 ± 6.5	
HFD	160 ± 9.3		166 ± 4.9		169 ± 4.6	
HFD+PM2.5	160 ± 7.3		169 ± 5.3		171 ± 3.8	

Data are demonstrated as mean ± standard deviation, ANOVA One-Way, followed by the Tukey's test. **Body weight** (Control, n=14; PM2.5, n=13; HFD, n=14; HFD+PM2.5, n=14). ***Difference between HFD and HFD+PM2.5 vs PM2.5 and Control in the 12 week**; **Glycemia** (Control, n=9; PM2.5, n=9; HFD, n=8;

HFD+PM2.5, n=9); **Triglycerides** (Control, n=7; PM2.5, n=6; HFD, n=7; HFD+PM2.5, n=6); **Total Cholesterol** (Control, n=6; PM2.5, n=7; HFD, n=6; HFD+PM2.5, n=7).

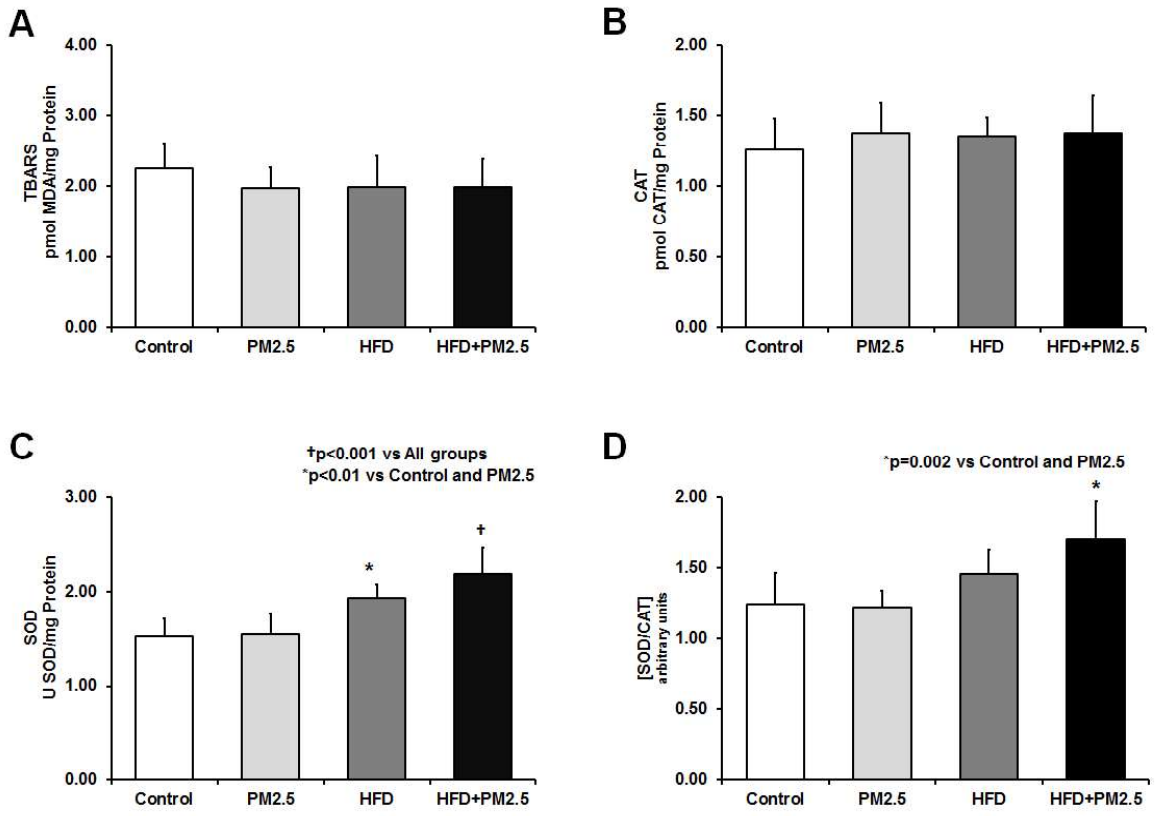

Figure 1. **Lung lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of mice exposed to HFD and $PM_{2.5}$.**

Data are demonstrated as mean ± standard deviation. ANOVA One-Way, followed by the Tukey's test. **A: lipid peroxidation (TBARS),** P=0.3147 $F_{3;38}$=1.226 (Control, n=11; PM2.5, n=7; HFD, n=11; HFD+PM2.5, n=10); **B: Catalase activity (CAT),** P=0.5443 $F_{3;43}$=0.7229 (Control, n=12; PM2.5, n=8; HFD, n=10; HFD+PM2.5, n=12); **C: Superoxide Dismutase activity (SOD),** †Difference between HFD+PM2.5 vs All groups P<0.001 $F_{3;29}$=17.064; *Difference between HFD vs Control and PM2.5 P<0.01 $F_{3;29}$=17.064 (Control, n=8; PM2.5, n=7; HFD, n=8; HFD+PM2.5, n=7) and **D: [SOD/CAT] ratio,** *Difference between HFD+PM2.5 vs Control and PM2.5 P=0.002; $F_{3;26}$=7.254 (Control, n=8; PM2.5, n=5; HFD, n=8; HFD+PM2.5, n=6).

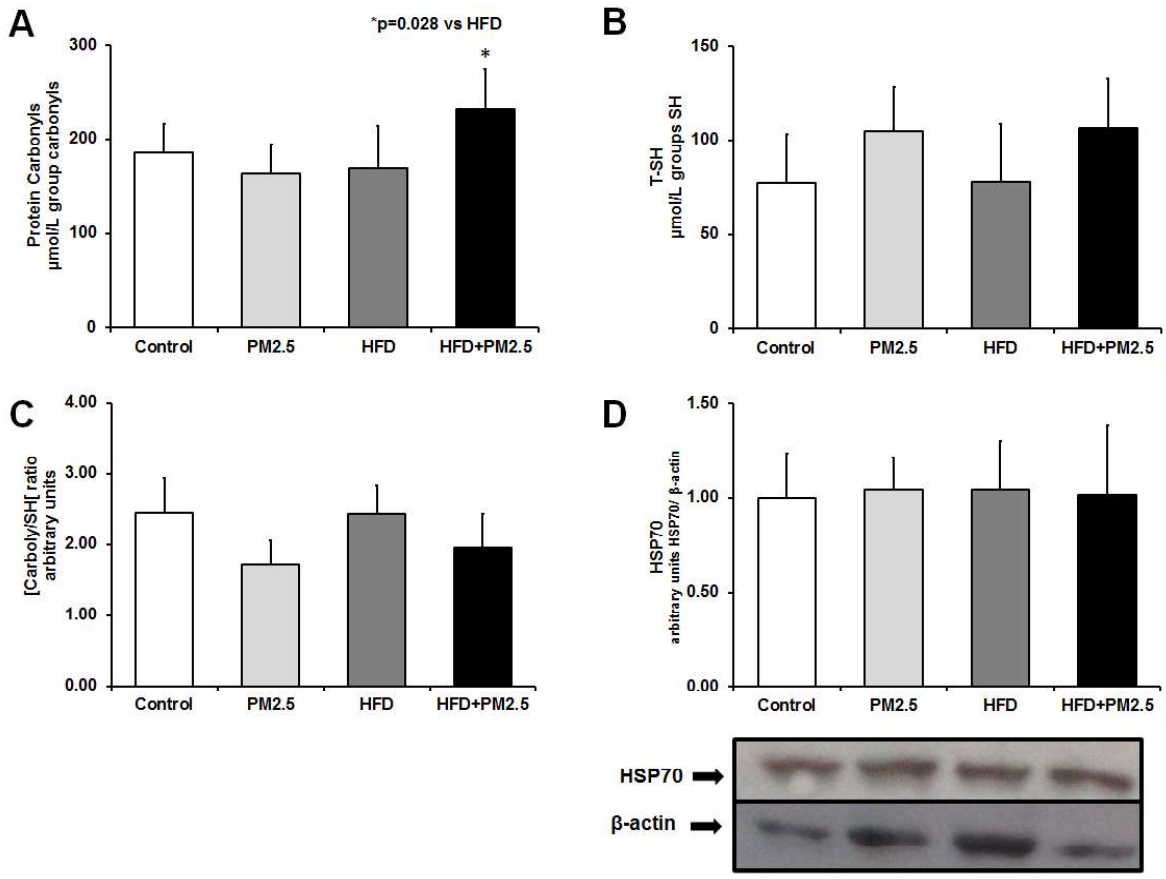

Figure 2. **Oxidative stress on the protein, and the formation of sulfhydryl groups and HSP70 expression in lung of mice exposed to HFD and $PM_{2.5}$.** Data are demonstrated as mean ± standard deviation. ANOVA One-Way, followed by the Tukey's test. **A: Protein Carbonyls (carbonyls groups),** *Difference between HFD+PM2.5 vs HFD P=0.0289 $F_{3;25}$ = 3.626 (Control, n=6; PM2.5, n=4; HFD, n=10; HFD+PM2.5, n=6); **B: T-SH groups,** P=0.1429 $F_{3;21}$=2.050 (Control, n=3; PM2.5, n=5; HFD, n=4; HFD+PM2.5, n=7); **C: [Carbolyl/SH] ratio,** P=0.0984 $F_{3;10}$=3.102 (Control, n=2; PM2.5, n=2; HFD, n=3; HFD+PM2.5, n=4); **D: HSP70 expression,** P=0.9923 $F_{3;22}$= 0.03129 (Control, n=4; PM2.5, n=6; HFD, n=7; HFD+PM2.5, n=6).

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demostra que o consumo de dieta hiperlipídica associado à exposição crônica ao material particulado fino provoca alterações nos parâmetros oxidativos pulmonares.

a) Quanto à peroxidação lipídica podemos destacar que não houve alterações nos pulmões dos animais tratados com a associação;

b) Quanto à atividade antioxidante da enzima SOD, houve maior atividade nos pulmões nos animais tratados com a associação e somente com a dieta hiperlipídica;

c) Quanto à atividade antioxidante da enzima CAT, não houve modificações;

d) Quanto ao dano oxidativo proteico, observado aumento de grupos carbonil nos animais tratados com a associação;

e) Quanto a formação de grupos tióis, não houve modificações nos tratamentos;

f) Quanto à expressão intracelular de HSP70, não observamos diferenças em nenhum dos tratamentos.

Neste sentido, a associação entre dieta hiperlipídica e a exposição crônica a baixas doses de material particulado fino diariamente é capaz de causar dano oxidativo às proteínas e modificar atividade enzimática antioxidante pulmonar, fundamentalmente pelo aumento da atividade da SOD. O aumento da razão SOD/CAT, pode representar um desequilíbrio na defesa antioxidante pulmonar e contribuir para o dano oxidativo pulmonar causado pela associação HDF+$PM_{2.5}$.

7. ANEXOS

7.1 Normas do periódico Inhalation Toxicology

Inhalation Toxicology
Instructions for Authors

About the Journal
Aims and Scope
Editor-in-Chief

Manuscript Submission

Manuscript Preparation
File preparation and types
Title Page
Abstract
Main Text
Acknowledgments and Declaration of Interest statements
References
Tables
Illustrations
Notes on Style

Editorial Policies
Authorship
Submission
Peer Review
Ethics and Consent
Copyright and Permissions
Declaration of Interest
NIH and Public Access Policy

Additional Information
Proofs
Reprints
Color figure charges
Contact the Publisher

About the Journal
Aims and Scope
Inhalation Toxicology is a peer-reviewed monthly publication providing a key forum for the latest accomplishments and advancements in concepts, approaches, and procedures presently being used to evaluate the health risk associated with airborne chemicals.

The journal publishes original research, reviews, symposia, and workshop topics involving the respiratory system's functions in health and disease, the pathogenesis and mechanism of injury, the extrapolation of animal data to humans, the effects of inhaled substances on extra-pulmonary systems, as well as reliable and innovative models for predicting human disease.
Editor-in-Chief
Donald E. Gardner, PhD Savannah, GA USA

Manuscript Submission

All submissions should be made online at Inhalation Toxicology's ScholarOne Manuscripts site. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the 'get help now' link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text under a subheading "Declaration of interest", and, where available within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site).

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgments; Declaration of Interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Inhalation Toxicology publishes the following manuscript types:

- Original papers
- Reviews
- Measurement technology
- Modelling/symmetry
- Letters to the Editor

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person.

Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 250 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

Original articles
The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.
Methods: This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. ***Inhalation Toxicology*** requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers.
Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations.
Discussion: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.
Conclusions: This must summarize the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalized to a broader study population. Please also include an additional paragraph describing:

- What is new/novel about this research
- What critical issues this research addresses
- Relevance of the research to humans

Reviews

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed.

Wherever possible, use primary resources, avoiding “Data on File”, “Poster” or other unpublished references.

Acknowledgments and Declaration of Interest sections

Acknowledgments and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for **authorship** should also be acknowledged here.

Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see “Declaration of Interest section” below.

Acknowledgments section

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading ‘Declaration of interest’. If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: *The authors report no declarations of interest*. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the ‘Declaration of interest’ field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name.
Examples:

- *Journal*: Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. (2004). Chemical basis for the biological activity of Imexon and related Cyanaziridines. J Med Chem, 47, 218-23.
- *Book*: Vyas SP, Khar RK. (2001). Targeted and controlled drug delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.
- *Contribution to a Book*: Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. (1978). Methods to achieve controlled drug delivery: The biomedical engineering approach. In: Robinson JR, ed. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 557-93
- *Electronic Resources*: Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke, SL, Lee K-H, (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (Silybum marianum) on Epstein-Barr Virus Activation. Pharm Biol [Online] Available at: http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592. Accessed on 12 April 2009

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in the text

- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click here.

For information on color figures and charges please click here.

Notes on Style

General Style

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise US English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.
2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized.
3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
4. “US” is preferred to “American”, “USA” to “United States”, and “UK” to “United Kingdom”.
5. Double quotation marks rather than single are used unless the “quotation is ‘within’ another”.
6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: “e.g.”; “i.e.”; “cf.”. Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.
7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: “The 1980s [not the 1980’s] saw …”. Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: “The APU’s findings that …” but note that the plural is “APUs”.
9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. “The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s …” and subsequently, “The APU studies of achievement …”, in a reference “(Department of Education and Science [DES] 1989a)”.

10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: “From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses”.
11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, “African-American”, “Hispanic” and “Native American” are used, e.g. “The African-American presidential candidate, Jesse Jackson …”; for the UK, “Afro-Caribbean” (not “West Indian”), etc.
12. Material to be emphasised by italicisation in the printed version should be italicized in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.
13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). “%” (not “per cent”) should be used in typescripts.
14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgments section. The style of the title is shown by the following example:
    “Appendix C: The random network generator”.
    Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as “the appendix” and not called “Appendix A”.

Abbreviations and nomenclature

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the CSE Style Manual available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA.

Mathematics

Please click here for more information on the presentation of mathematical text.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate Declaration of interest section at the end of the paper. Acknowledgments of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgments section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶

(paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialize symbol sequence within tables.

Editorial Policies

Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Pharmaceutical Science adheres to the ICMJE guidelines (http://www.icmje.org/#author), which state that "authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published"1. All other contributors should be listed in the Acknowledgments section.

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

Redundant publications and plagiarism

Inhalation Toxicology considers all manuscripts on the strict condition that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere.

Inhalation Toxicology will not consider, in general, redundant publications, i.e. "publication of a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media" (International Committee on Publication Ethics: http://www.icmje.org/publishing_4overlap.html). This rule applies whether the overlapping papers are from the same authors or not.
In addition, Informa has a strict policy against plagiarism. We define plagiarism as the use of extracts from another person's work that are not placed in quotation marks, without the permission of that person, and without acknowledgement to that person (using the appropriate reference style), with the result that your article presents these extracts as original to you. By submitting your work to an Informa Healthcare journal, you warrant that it is your original work, and that you have secured the necessary written permission from the appropriate copyright owner or authority for the reproduction of any illustration or other material.
Paraphrasing, defined as "taking portions of text from one or more sources, crediting the author/s, but only changing one or two words or simply rearranging the order, voice (i.e., active vs. passive) and/or tense of the sentences" by the US Office on Research Integrity (http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/7.shtml), will not be accepted if found to be used extensively and to make up large sections of the manuscript. Extensive paraphrasing will not be deemed original work and will be viewed as redundant publication and/or plagiarism.

Informa Healthcare adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases (e.g. when an article is retracted), offending authors will be reported to their institution‟s Ethics committee and may be banned from submitting to Informa Healthcare journals in the future. Please refer to the COPE website for the detailed workflows for handling allegations of plagiarism or redundant publication (http://www.publicationethics.org/resources/flowcharts).

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers‟ feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

- Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.
- Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).
- To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.
- All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (http://www.wma.net/e/policy/b3.htm).
- When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking here

Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking here.

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted.

To avoid any doubt as to what must be disclosed, Inhalation Toxicology requests that all authors complete and submit the conflict of interest form developed by ICMJE. The forms must be uploaded to the journal‟s ScholarOne Manuscript site along with the manuscript files during the submission process.

In addition, all potential conflicts of interest must be stated within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest". If there are no declarations, authors should explicitly state that there are none. Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement (either stating the disclosures or reporting that there are none) is included and the ICMJE forms are uploaded.

The completed ICMJE forms will be made available to reviewers and, if the article is accepted, published online as supplementary material for transparency. The Declaration of interest statement will appear in the published

article. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to COPE guidance.

The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationships or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly, readers can make objective judgements concerning the work product.

NIH/Wellcome Public and Open Access Policies

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Public and Open Access Policies, Informa Pharmaceutical Science acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research results may benefit future scientific and medical research. Because we value the current and future contributions our journals make to the scientific body of knowledge, we have made certain that our policies accommodate those authors who wish to submit to PubMed Central.

As part of our author services program, Informa Pharmaceutical Science will deposit to PubMed Central (PMC) and UK PubMed Central (UKPMC) author manuscripts reporting NIH or Wellcome Trust funded research.

This service will help authors to comply with the NIH and Wellcome Trust revised 'Public Access Policy' and „Open Access Policy", respectively.

NIH policy
NIH-funded authors must submit to PMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Click here for more information.

Wellcome Trust policy
Wellcome-funded authors must submit to UKPMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on UKPMC no later than 6 months after final publication.

Click here for more information.

Informa Pharmaceutical Science will deliver to PMC/UKPMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review. We will also authorise the author manuscript"s public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in print or electronic form (whichever is the sooner). Following the deposit, authors will receive further communications from the NIH Manuscript Submission System/UK Manuscript Submission System with respect to the submission.

Under our Author Rights policy, authors also have the right to post their version of the submitted author manuscript (pre-print), or their version of the final

published article (post-print) on their personal or institutional web site. Post-print web postings are subject to an embargo of 12 months. Please note that authors should not post manuscripts directly to PMC/UKPMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (e.g., to a listserv or database connected to a public access server).

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author‟s preferential rate of $25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by clicking here.

Color figure charges

Any figure submitted as a color original will appear in color in the Journal‟s online edition free of charge. Print copy color reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with color is US $1000/£500, each subsequent page is charged at US $500/£250. There are no charges for non-color pages.

Contact the publisher

Click here for contact details for the Publisher.

7.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER DO COMITÊ

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIJUI, assim como as responsabilidades do pessoal envolvido no uso de animais da Resolução Normativa Nº1 do CONCEA, de 09 de julho de 2010, descreve no seu artigo 9º Aos pesquisadores, docentes e responsáveis técnicos por atividades experimentais, pedagógicas ou de criação de animais compete:

I – assegurar o cumprimento das normas de criação e uso ético de animais;

II – submeter à CEUA proposta de atividade, especificando os protocolos a serem adotados;

III – apresentar à CEUA, antes do início de qualquer atividade, as informações e a respectiva documentação, na forma e conteúdo definidos nas Resoluções Normativas do CONCEA;

IV – assegurar que as atividades serão iniciadas somente após decisão técnica favorável da CEUA e, quando for o caso, da autorização do CONCEA;

V – solicitar a autorização prévia à CEUA para efetuar qualquer mudança nos protocolos anteriormente aprovados;

VI – assegurar que as equipes técnicas e de apoio envolvidas nas atividades com animais recebam treinamento apropriado e estejam cientes da responsabilidade no trato dos mesmos;

VII – notificar à CEUA as mudanças na equipe técnica;

VIII – comunicar à CEUA, imediatamente, todos os acidentes com animais, relatando as ações saneadoras porventura adotadas;

IX – estabelecer junto à instituição responsável mecanismos para a disponibilidade e a manutenção dos equipamentos e da infra-estrutura de criação e utilização de animais para ensino e pesquisa científica;

X – fornecer à CEUA informações adicionais, quando solicitadas, e atender a eventuais auditorias realizadas.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final.

Ijuí, 05 de novembro de 2013.

Prof. Daniel Curvello de Mendonça Müller
Coordenador da CEUA/UNIJUÍ

Comissão de Ética no uso de Animais CEUA UNIJUÍ