

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

Fernanda Giesel Baldissera

**Instilação de *Residual Oil Fly Ash*
(ROFA) Causa Aumento de HSP70 e
Estresse Oxidativo no Plasma Sem
Alterar Estado Redox e Resposta ao
Estresse em Tecidos Linfoides**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2015

Fernanda Giesel Baldissera

**Instilação de *Residual Oil Fly Ash*
(ROFA) Causa Aumento de HSP70 e
Estresse Oxidativo no Plasma Sem
Alterar Estado Redox e Resposta ao
Estresse em Tecidos Linfoides**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da 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**

Catálogo na Publicação

Baldissera, Fernanda Giesel

Instilação de Residual Oil Fly Ash (ROFA) causa aumento de HSP70 e estresse oxidativo no plasma sem alterar estado redox e resposta ao estresse em tecidos linfoides / Fernanda Giesel Baldissera. -- 2014.

86 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudia Ramos Rhoden ;
coorientador(a): Prof. Dr. Thiago Gomes Heck.

1. Poluição Atmosférica. 2. HSP70. 3. Estresse Oxidativo. 4. Tecidos linfoides. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

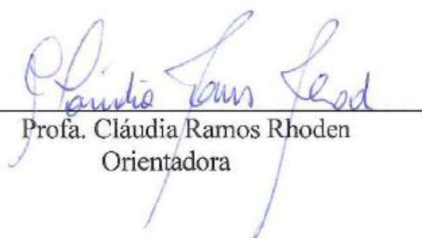
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

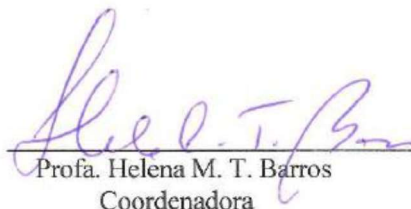
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA 544-2014

De acordo com o estabelecido previamente pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, realizou-se aos vinte e quatro dias do mês de novembro de dois mil e quatorze, às 9h, na sala 507 no Prédio Anexo da UFCSPA, a defesa da dissertação de mestrado da aluna **Fernanda Giesel Baldissera**, orientada pela professora Cláudia Ramos Rhoden e co-orientada pelo professor Thiago Gomes Heck no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA. O trabalho defendido intitula-se **“Instilação de Residual Oil Fly Ash (ROFA) Causa Aumento de HSP70 e Estresse Oxidativo no Plasma Sem Alterar Estado Redox e Resposta ao Estresse em Tecidos Linfoides”**. A Banca Examinadora foi composta pelos professores Mirna Stela Ludwig (Unijuí) e Alex Sander da Rosa Araújo (UFRGS) e Sérgio Luís Amantéa (UFCSPA). Após a abertura da sessão, a candidata dispôs de 45 minutos para expor seu trabalho. Ao término da apresentação, foi franqueada à platéia a possibilidade de dirigir perguntas à autora. Ao término da sessão foi anunciada a **aprovação** da candidata, conferindo-lhe o grau de Mestra em Ciências da Saúde: Farmacologia e Toxicologia. Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão e lavrada a presente ata, que será assinada pelo orientador da aluna e pela Coordenadora do Programa.

Porto Alegre, 24 de novembro de 2014.


Profª. Cláudia Ramos Rhoden
Orientadora


Profª. Helena M. T. Barros
Coordenadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me proporcionar a vida, repleta de saúde e capacidade de compreensão, permitindo que eu consiga construir conhecimento com o objetivo de melhorar a qualidade de vida das pessoas.

Para que este curso de Mestrado pudesse ser concluído com êxito, pude contar com a ajuda de muitas pessoas, as quais sou imensamente grata.

As pessoas que eu mais amo são também as que eu primeiro agradeço. Sou infinitamente grata à minha amada família: mãe Tânia, pai Élio e mana Laura, os quais sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos e com os quais sempre pude e sei que sempre poderei contar.

Para que algo seja feito é preciso ter a oportunidade para fazê-lo. Portanto, agradeço muito aos meus orientadores: Thiago Gomes Heck e Claudia Ramos Rhoden, e também à professora Mirna Stela Ludwig, os quais acreditaram no meu trabalho, muito me ensinaram e sempre me incentivaram a seguir em frente, mesmo quando as circunstâncias não estavam favoráveis.

Quero relatar aqui meu agradecimento especial aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Ensaio Biológicos/UNIJUÍ: Analú, Maicon e Renan, que me apoiaram e me auxiliaram técnico-cientificamente nos momentos que eu mais precisei durante o desenvolvimento prático deste trabalho. Agradeço, também de forma especial, aos demais amigos e colegas de laboratório que também contribuíram em muitos momentos para a realização desta pesquisa, são eles: Eloísa, Bethânia, Yohanna, Pauline e Eliara. Agradeço a todos os colegas do LEBio pela amizade e alegria no convívio diário, tornando o trabalho no laboratório mais leve e divertido.

Tenho muito a agradecer também aos amigos e colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica/UFCSPA: Gabriela, Marcella, Marlise, Priscila, Alessandra, Alan, Paulo, Grazielle e Maurício, pela carinhosa acolhida em Porto Alegre, pela amizade e pelo apoio técnico-científico.

Agradeço à professora Greice Montagner pelo apoio e incentivo em muitos momentos, bem como pelo auxílio técnico-científico, contribuindo de forma significativa para a conclusão satisfatória deste trabalho.

Agradeço também à Anderleia Bones e à Andréa Teixeira, responsáveis pelos laboratórios dos cursos de Farmácia e Química da UNIJUÍ, respectivamente, as quais auxiliaram em muitos momentos técnico-científicos deste trabalho.

*“Em si, a vida é neutra.
Nós a fazemos bela, nós a fazemos feia;
a vida é a energia que trazemos a ela.”*

(Osho)

RESUMO

A exposição ao material particulado, especialmente ao material particulado fino (MP_{2,5}), tem sido associada ao desenvolvimento de condições adversas à saúde, desencadeando estresse oxidativo e alterações do conteúdo das proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em muitos tecidos. *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) são resíduos inorgânicos dos combustíveis a óleo, os quais contribuem para a composição e a toxicidade do MP_{2,5} urbano. O objetivo deste estudo foi avaliar se a instilação de ROFA por três dias consecutivos em ratos induz alterações nos níveis de HSP70 no plasma e em tecidos linfoides (linfonodos mesentéricos, timo e baço) e se estão associadas com alterações no estado redox (grupos carbonil, peroxidação lipídica, atividade da SOD e da CAT e grupos sulfidril). Exposição aguda ao ROFA demonstrou aumento do conteúdo plasmático de eHSP70 (19 %), especialmente eHSP72 (29 %), e estresse oxidativo proteico no plasma (aumento de 9 % dos grupos carbonil, de 14 % da atividade da SOD, de 29 % das atividades da SOD/CAT e diminuição de 14 % dos grupos sulfidril), sem alterar a concentração basal de leucócitos circulantes. A instilação de ROFA não alterou o conteúdo de HSP70 e o estado redox nos tecidos linfoides analisados, sugerindo que a exposição aguda a este poluente não causou efeito nestes tecidos. Nossos resultados sugerem que eHSP70 apresenta potencial como biomarcador de risco subclínico desencadeado por estresse oxidativo após exposição aguda ao ROFA.

Palavras-chave: *Residual Oil Fly Ash*. HSP70. Estresse oxidativo. Tecidos linfoides.

ABSTRACT

The exposure to particulate matter, including to fine particulate matter (PM_{2.5}), has been associated with the development of adverse health conditions, promoting oxidative stress and changes in the heat shock proteins of 70 kDa (HSP70) content in many tissues. *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) are inorganic residues present in the fuel oil and contribute to the urban PM_{2.5} toxicity by inducing oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate if ROFA instillation for three consecutive days in rats induces alterations in the HSP70 levels in the plasma and in the lymphoid tissues and if are associated with alterations in the redox state (carbonyl groups, lipid peroxidation, SOD and CAT activities and sulfhydryl groups). Acute exposure to ROFA showed higher eHSP70 (plasma) content (19 %), especially eHSP72 (29 %), and plasma oxidative stress (increased 9 % in protein carbonyl groups, 14 % in SOD activity, 29 % in SOD/CAT activities, and decreased 14 % in sulfhydryl groups), without modifying circulating leukocytes levels. ROFA instillation did not change the HSP70 content and redox state in lymphoid tissues and support hypothesis this pollutant acutely is not able to elicit damage in these tissues. Our results suggest the high content of eHSP70 is a warning sign and mark subclinical risk condition triggered by oxidative stress after acute instillation of ROFA.

Keywords: *Residual Oil Fly Ash*. HSP70. Oxidative stress. Lymphoid tissues.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes e reações de Fenton e de Haber-Weiss.....	21
Figure 1 – HSP70 content in plasma.....	66
Figure 2 – Plasma oxidative stress.....	67
Figure 3 – Total and differential leukocytes counts.....	68

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Trace elements concentration of the ROFA particles.....	69
Table 2 – HSP70 content and oxidative stress of lymphoid tissues.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

AIF – *apoptosis-inducing factor* / fator indutor de apoptose

Apaf-1 – *apoptotic protease activating factor* / fator de ativação de protease apoptótica 1

AP-1 – *activator protein 1* / ativador de proteína 1

ATP – adenosina trifosfato

BiP – *binding immunoglobulin protein*

CAT – *catalase* / catalase

CCR5 – *chemokine receptor* / receptor de quimiocina 5

CD40 – *cluster differentiation 40* / grupo de diferenciação 40

CD91 – *cluster differentiation 91* / grupo de diferenciação 91

CO – monóxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (BR)

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNPH – *2,4-dinitrophenylhydrazine*

DTNB – 5'5'dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*

eHSP70 – *extracellular heat shock proteins 70 kDa* / proteínas de choque térmico extracelular de 70 kDa

EPA – *Environmental Protection Agency (USA)* / Agência de Proteção Ambiental (EUA)

ERO – espécies reativas de oxigênio

GPx – glutatona peroxidase

GRP78 – *glucose regulated proteins 78 kDa* / proteínas reguladas por glicose de 78 kDa

GRP75 – *glucose regulated proteins 75 kDa* / proteínas reguladas por glicose de 75 kDa

GSH – glutatona reduzida

GSSG – glutatona oxidada

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HSC70 – *heat shock cognates* / proteínas de choque térmico cognatas

HSP – *heat shock proteins* / proteínas de choque térmico

HSP40 – *heat shock proteins 40 kDa* / proteínas de choque térmico de 40 kDa

HSP60 – *heat shock proteins 60 kDa* / proteínas de choque térmico de 60 kDa

HSP70 – *heat shock proteins 70 kDa* / proteínas de choque térmico de 70 kDa

HSP72 – *heat shock proteins 72 kDa* / proteínas de choque térmico de 72 kDa

HSP73 – *heat shock proteins 73 kDa* / proteínas de choque térmico de 73 kDa

HSP90 – *heat shock proteins 90 kDa* / proteínas de choque térmico de 90 kDa

HSP110 – *heat shock proteins 110 kDa* / proteínas de choque térmico de 110 kDa

HSPA – genes das proteínas de choque térmico de 70 kDa

HRP – *horseradish peroxidase*

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

iNOS – *inducible nitric oxide synthase* / óxido nítrico sintase induzível

JAK/STAT – *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

kDa – *kilodaltons* / quilodaltons

KPi – *potassium phosphate* / fosfato de potássio

LOX-1 – *lectin-like ox-LDL receptor*

MDA – malondialdeído

MP – material particulado

MP_{0,1} – material particulado ultrafino

MP_{2,5} – material particulado fino

MP₁₀ – material particulado grosseiro

NEFs – *nucleotide exchange factors* / fatores trocadores de nucleotídeo

NF- κ B – *nuclear factor-kB* / fator nuclear κ B

NIH – *National Institutes of Health (USA)*

NO – óxido nítrico

NO_x – óxido/dióxido de nitrogênio

O₂ – oxigênio molecular

O₂⁻ – radical ânion superóxido

O₃ – ozônio

OH[•] – radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMP – *pathogen-associated molecular pattern* / padrão molecular associado à patógeno

PM – *particulate matter*

PM_{2,5} – *fine particulate matter*

PMSF – *phenyl-methyl-sulfonyl fluoride*

RL – radicais livres

ROFA – *Residual Oil Fly Ash*

ROO[•] – radical peroxil

ROS – *reactive oxygen species*

SDS – *sodium dodecyl sulfate* / dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* / dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida

SO₂ – dióxido de enxofre

SOD – superóxido dismutase / *superoxide dismutase*

SREC-1 – *scavenger receptor expressed by endothelial cells-1* / receptor scavenger expresso pelas células endoteliais-1

TBARS – *thiobarbituric acid-reactive substances* / substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR – *toll-like receptor* / receptor do tipo toll

TLR2 – *toll-like receptor* / receptor do tipo toll 2

TLR4 – *toll-like receptor* / receptor do tipo toll 4

TNF – *tumor necrosis factor* / fator de necrose tumoral

TNF-α – *tumor necrosis factor* / fator de necrose tumoral α

UV – ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	14
1.2 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E ESTRESSE OXIDATIVO	18
1.3 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	26
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
REFERÊNCIAS	38
4 ARTIGO	50
ABSTRACT	51
INTRODUCTION	52
MATERIALS AND METHODS	53
Animals	53
Experimental Design	53
Characterization of Particles	54
Total and Differential Leukocytes Counts.....	55
Tissue Preparation	55
Protein Determination.....	56
HSP70 Content	56
Protein Carbonyls	57
Lipid Peroxidation	58
Sulfhydryl.....	58
Catalase and Superoxide Dismutase Activities.....	59
Statistical Analysis.....	59
RESULTS	59
DISCUSSION AND CONCLUSIONS	60
REFERENCES	63
FIGURES	66
Figure 1. HSP70 content in plasma.....	66
Figure 2. Plasma oxidative stress.....	67
Figure 3. Total and differential leukocytes counts	68
TABLES	69
Table 1. Trace elements concentration of the ROFA particles.....	69
Table 2. HSP70 content and oxidative stress of lymphoid tissues.....	70
5 CONCLUSÃO	71
ANEXOS	72
ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais	72
ANEXO B – Normas para submissão de artigo: <i>Inhalation Toxicology</i>	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Respirar ar puro é um dos requisitos básicos para a saúde e o bem-estar dos seres humanos. Contudo, fatores relacionados ao desenvolvimento econômico, como urbanização, consumo de energia, transporte e aumento da população urbana têm contribuído para poluir a atmosfera. A exposição aos poluentes atmosféricos é um perigo para a saúde em todo o mundo e um problema global cada vez mais preocupante. Isto se deve à diversidade dos poluentes, seus efeitos tóxicos/adversos observados e ao grande número de pessoas em risco (CHEN; KAN, 2008).

A associação entre saúde e poluição atmosférica tornou-se evidente a partir de um fato que ocorreu em 1952, conhecido mundialmente como *Big Smoke* (Grande Fumaça). Neste período, dias de intensa poluição atmosférica na cidade de Londres resultou em cerca de 12000 mortes, sendo considerado o mais importante episódio associado à poluição atmosférica em termos de impacto na ciência, percepção pública de poluição do ar e regulamentação governamental. O forte aumento do nível de poluição do ar foi imediatamente seguido pelo aumento acentuado na taxa de morbidade e mortalidade (BELL; DAVIS; FLETCHER, 2004; STONE, 2002; DOOLEY, 2002).

É importante ressaltar que, além de prejudicar a saúde e a qualidade de vida da população, a poluição atmosférica também resulta em altos custos para os governos. Aumento do número de atendimentos de saúde, das internações hospitalares e do uso de medicamentos são exemplos de despesas que poderiam ser reduzidas com a melhoria da qualidade do ar (BRASIL, 2014).

O impacto negativo da poluição atmosférica na saúde pública evidencia a necessidade de estabelecer padrões de qualidade do ar, estabelecendo concentrações limítrofes de poluentes na atmosfera. Estes padrões são definidos por cada país e são componentes importantes da gestão de risco e políticas ambientais nacionais (WHO, 2006). A qualidade do ar em países desenvolvidos tem aumentado significativamente nas recentes décadas, porém, países em desenvolvimento e em transição têm permanecido sob índices de poluição do ar indesejáveis (CHEN; KAN, 2008).

A poluição atmosférica é considerada o maior fator de risco ambiental de morte, tendo ocasionado cerca de sete milhões de mortes em 2012, uma em cada oito do total de mortes no mundo. Este dado é mais que o dobro da estimativa prevista (WHO, 2014). Para tanto, muitos estudos têm sido realizados sob vários aspectos dos poluentes do ar, demonstrando que eles podem afetar os seres humanos durante todas as fases da vida, desde a concepção até o período senil (RUCKERL *et al.*, 2011).

Neste contexto, estudos epidemiológicos evidenciam que há forte associação entre exposição à poluição do ar e o desenvolvimento de doenças, especialmente respiratórias, cardiovasculares e câncer, tanto em exposição a curto (horas ou dias) quanto a longo prazo (meses ou anos) (POPE *et al.*, 2002; ANALITIS *et al.*, 2006; MATÉ *et al.*, 2010; STRAK *et al.*, 2012). Além disso, em meio a população existem grupos mais suscetíveis aos efeitos adversos dos poluentes atmosféricos, como idosos, crianças e os que apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiopulmonares ou estas doenças já estabelecidas (WHO, 2013).

A poluição atmosférica é caracterizada pela contaminação de ambiente interno ou externo por qualquer agente químico, físico ou biológico que modifique as características naturais da atmosfera (WHO, 2014). Esta condição ambiental é uma mistura heterogênea de gases, líquidos e material particulado (MP) que podem ocasionar importantes efeitos adversos à saúde humana, conforme citado anteriormente. É possível afirmar que as progressivas alterações na composição da atmosfera são devidas, principalmente, à combustão de compostos fósseis utilizados para geração de energia e nos meios de transporte. As partículas decorrentes destes processos de combustão apresentam núcleo de carbono elementar revestido por camada de compostos químicos, incluindo hidrocarbonetos orgânicos, metais, nitratos e sulfatos. Estas substâncias químicas, juntamente com compostos biológicos, como endotoxinas e fragmentos celulares, são os compostos mais prevalentes na atmosfera (BROOK *et al.*, 2004; NEL, 2005).

Os poluentes do ar diferem entre si pela sua composição química, propriedades de reação, emissão e persistência no ambiente, habilidade em ser transportado por longas ou curtas distâncias e seu impacto na saúde humana. Dentre suas similaridades, podem ser classificados em categorias: gases poluentes, como dióxido

de enxofre (SO₂), óxido/dióxido de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃) e componentes orgânicos voláteis, como benzeno; poluentes orgânicos persistentes, como dioxinas; metais pesados, como chumbo e mercúrio; e MP (KAMPA; CASTANAS, 2008).

Dentre os constituintes da poluição do ar, o MP destaca-se pela alta concentração atmosférica, bem como pelo amplo contato com a população, apresentando forte potencial de dano ao organismo (NELIN *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos e experimentais têm constatado forte associação entre o MP e os efeitos adversos ao organismo da exposição aguda (horas ou dias) e crônica (meses ou anos) à poluição atmosférica (POPE; DOCKERY, 2006; DONALDSON, 2003; DOMINICI *et al.*, 2006; RHODEN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2005). Recentemente a poluição atmosférica foi caracterizada como carcinogênica e foi atribuída ao MP esta propriedade deletéria, tendo ocasionado aumento na incidência de câncer, especialmente de pulmão. Estima-se que 3 % e 5 % das mortes por complicações cardiopulmonares e por câncer de pulmão, respectivamente, sejam atribuídas ao MP (WHO, 2013). Os fatores que determinam os riscos do MP à saúde são o tamanho da partícula, área de superfície e composição química (NEL, 2005).

O MP consiste de mistura heterogênea de partículas líquidas e sólidas, e substâncias orgânicas e inorgânicas suspensas no ar, as quais alteram continuamente em tamanho e composição química no espaço e no tempo (GHIO *et al.*, 2012; BROOK *et al.*, 2004). Os principais componentes do MP são sulfatos, nitratos, amônia, cloreto de sódio, carbono negro (“*black carbon*”), poeira mineral e água (WHO, 2014).

Estas partículas são provenientes de fontes naturais e antropogênicas. Dentre as fontes naturais incluem-se os incêndios florestais, emissões vulcânicas, pólen, bem como mofo. O MP proveniente de fontes antropogênicas apresenta maior relevância à problemática poluição atmosférica, sendo possível citar as emissões industriais e de veículos a motor, usinas, fragmentação de pneus e ressuspensão de poeira de estrada, entre outros. Cerca de 40 % do MP de centros urbanos é decorrente do uso de combustíveis fósseis (GHIO *et al.*, 2012). As partículas atmosféricas também podem ser caracterizadas como primárias ou secundárias: partículas primárias são emitidas diretamente na atmosfera, como a fuligem do diesel, enquanto as secundárias são

originárias da transformação físico-química de gases, como formação de nitrato e sulfato a partir de ácido nítrico e dióxido de enxofre (BROOK *et al.*, 2004).

As partículas do MP podem ser classificadas quanto ao seu diâmetro aerodinâmico (em micrômetros – μm) em grosseiras, finas e ultrafinas. As partículas grosseiras apresentam diâmetro entre 10 μm e 2,5 μm (MP_{10}) e são principalmente derivadas de fontes naturais, especialmente materiais da crosta terrestre e processos de moagem, ou ainda agregação de partículas menores. As partículas finas são menores que 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$) e as ultrafinas menores que 0,1 μm ($\text{MP}_{0,1}$), ambas resultantes, principalmente, da combustão de compostos fósseis (KAMPA; CASTANAS, 2008; BROOK *et al.*, 2004).

De modo geral, MP_{10} ou partículas maiores tendem a se depositar no trato respiratório superior, acima da região traqueobrônquica, enquanto partículas menores, como o $\text{MP}_{2,5}$, depositam-se no interior dos pulmões, sendo capazes de atingir os alvéolos pulmonares (BROOK *et al.*, 2004). Desta forma, as partículas finas e ultrafinas, quando comparadas às grosseiras, são mais deletérias ao organismo pela sua capacidade de invadir o parênquima pulmonar, podendo causar alterações no metabolismo redox deste tecido, desencadear sinalizações pró-inflamatórias e ocasionar dano tecidual (HARRISON; YIN, 2000). Além disso, as partículas menores permanecem mais tempo em suspensão na atmosfera e, assim, podem ser submetidas a transformações químicas ou transportadas por longas distâncias, aumentando seu poder de dano biológico (SCHROEDER *et al.*, 1987).

Evidências epidemiológicas e experimentais contribuem para o estabelecimento de concentrações atmosféricas limítrofes de MP. São estabelecidos níveis médios de exposição diária e anual de MP por metro cúbico de ar. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a exposição média diária e anual ao MP_{10} não ultrapasse 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente e a exposição média diária e anual ao $\text{MP}_{2,5}$ não seja superior a 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente (WHO, 2006). Já a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos estabelece limite de concentração máxima diária de MP_{10} de 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e de $\text{MP}_{2,5}$ é estabelecido, em média, 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por dia e 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por ano (EPA, 2003). Contudo, concentrações abaixo das recomendadas pela OMS ainda podem resultar em agravos à saúde. No Brasil, o Conselho Nacional

do Meio Ambiente (CONAMA) regulamentou que a concentração máxima de partículas inaláveis (MP₁₀) no ar não deve ultrapassar 150 µg/m³ por 24 horas e 50 µg/m³ anual (BRASIL, 1990).

Com base nos efeitos adversos do MP_{2,5} à saúde humana, a OMS considera a concentração atmosférica destas partículas como o melhor indicador de risco à saúde por exposição à poluição do ar (WHO, 2006). A cada aumento de 10 µg/m³ na concentração atmosférica média de PM_{2,5} em exposição a longo prazo está associado ao aumento no risco de mortalidade em, aproximadamente, 4 %, 6 % e 8 % para todas as causas, cardiopulmonar e câncer de pulmão, respectivamente (POPE *et al.*, 2002). Além disso, estima-se que a diminuição de 10 µg/m³ na concentração atmosférica de PM_{2,5} está associada com aumento na expectativa de vida (cerca de 0,61 ± 0,20 anos) (POPE; EZZATI; DOCKERY, 2009).

No contexto destas considerações, o resultado de uma pesquisa com seis capitais brasileiras evidenciou dados preocupantes com relação à poluição do ar no Brasil. Este estudo constatou que cinco destas capitais apresentaram média de concentração de PM_{2,5} acima do limite recomendado pela OMS no período de junho de 2007 a agosto de 2008, resultando em milhares de mortes associadas à exposição destas partículas: São Paulo – 28,1 µg/m³ de PM_{2,5} e 9700 mortes, Rio de Janeiro – 17,2 µg/m³ de PM_{2,5} e 2700 mortes, Belo Horizonte 14,7 µg/m³ de PM_{2,5} e 500 mortes, Porto Alegre 13,4 µg/m³ de PM_{2,5} e 400 mortes e Curitiba 14,4 µg/m³ de PM_{2,5} e 300 mortes. Recife foi a única capital que apresentou média de concentração de PM_{2,5} abaixo do limite recomendado – 7,3 µg/m³, mantendo os índices deste poluente relativamente constantes durante o ano (MIRANDA *et al.*, 2012).

1.2 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é o principal mecanismo responsável pelos efeitos tóxicos da poluição atmosférica, especialmente do MP (LODOVICI; BIGAGLI, 2011). Esta condição é caracterizada pelo desequilíbrio entre componentes pró-oxidantes e antioxidantes no organismo, com predominância do primeiro, desencadeando potencial de dano (ASIMOV, 2007). Para que o dano oxidativo seja estabelecido, são necessárias condições: carga oxidativa aumentada e/ou diminuição de níveis

antioxidantes, bem como a detecção de indicadores de dano oxidativo a biomoléculas, especialmente lipídios, proteínas e DNA (GIUSTARINI *et al.*, 2009). O dano oxidativo é resultante de modificações oxidativas de macromoléculas celulares, ativação de cascatas cinases e fatores de transcrição, além de liberação de mediadores inflamatórios. Estas alterações podem levar à apoptose ou necrose celular, ou ainda dano tecidual (LYKKESFELDT, 2007; GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012).

Os seres humanos utilizam o oxigênio molecular (O_2) para a síntese de energia. O quadro metabólico aeróbio confere reações de oxidação e redução aos sistemas biológicos, denominadas reações redox, as quais representam a base para inúmeros mecanismos bioquímicos do organismo. Para que as reações redox ocorram é necessário a presença de agentes redutores (antioxidantes) e agentes oxidantes, caracterizados como doadores e receptores de elétrons, respectivamente (VALKO *et al.*, 2006). Concomitantemente com a produção de energia, o metabolismo do O_2 origina, de forma inerente e contínua, espécies intermediárias pró-oxidantes denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) (VALKO *et al.*, 2007). Por estar distribuído por todo o organismo, o O_2 é a principal fonte de ERO. Estima-se que 5 % do O_2 inalado torna-se ERO, aproximadamente 40×10^{21} moléculas por pessoa ao dia (STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009).

As ERO promovem efeitos deletérios, bem como benéficos ao organismo, dependendo de sua concentração. Quantidade baixa a moderada de ERO promove benefícios aos seres vivos, estando envolvidas na defesa contra agentes infecciosos, vias de sinalização e proliferação celular (VALKO *et al.*, 2007). Do contrário, excesso de ERO pode danificar macromoléculas celulares, levando à inibição de vias de transdução de sinais e podendo alterar o funcionamento celular normal (GIUSTARINI *et al.*, 2009).

As ERO são divididas em dois grupos de compostos, radicais livres (RL) e compostos não radicalares. Os RL são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura atômica, conferindo-lhes alta reatividade inespecífica (LYKKESFELDT, 2007; STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009), como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}). Os RL podem ser convertidos em espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mais

estáveis, porém capazes de originar RL em compartimentos celulares diferentes dos que foram formados (FANG *et al.*, 2002; KOHEN; NYSKA, 2002).

Todas as células vivas sob condições aeróbias são continuamente expostas a oxidantes, derivados de fatores endógenos e exógenos. Dentre as fontes endógenas de oxidantes incluem-se a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o sistema enzimático citocromo P-450 nos hepatócitos, reações de células imunes durante processos inflamatórios, enzimas como a xantina oxidase e óxido nítrico sintase, além da oxidação por metais de transição e/ou RL, como ocorrem nas reações de Fenton e Haber-Weiss, respectivamente. Fontes exógenas de ERO também contribuem direta ou indiretamente para a carga oxidante total, incluindo poluentes atmosféricos, xenobióticos, radiações, patógenos, gases tóxicos, toxinas. Dieta inadequada pode resultar em estresse oxidativo indiretamente, prejudicando mecanismos de defesa (VALKO *et al.*, 2006; LYKKESFELDT, 2007; YOUNG; WOODSIDE, 2001).

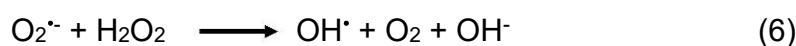
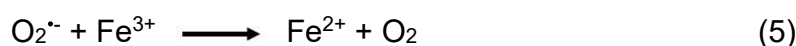
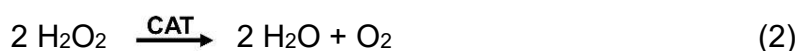
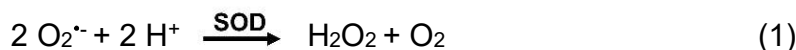
A exposição do organismo às ERO exige a ação de mecanismos de defesa para manter a homeostasia redox e garantir a sobrevivência. Dentre estes mecanismos estão as substâncias antioxidantes, definidas como “qualquer substância que prorroga, previne ou remove dano oxidativo a moléculas alvo”, as quais são sintetizadas *in vivo* ou decorrentes da dieta e classificadas em enzimáticas e não-enzimáticas. As enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e as defesas não enzimáticas são compostas por moléculas que diminuem a formação de ERO, como albumina e transferrina, proteínas que protegem biomoléculas contra dano oxidativo por outros mecanismos, como chaperonas, além de compostos com alta afinidade oxidativa pelas ERO, preservando importantes biomoléculas contra dano, como glutathiona (GSH), α -tocoferol, bilirrubina, ascorbato, albumina, entre outros (RETH, 2007).

Dentre as enzimas antioxidantes, a SOD é encontrada na mitocôndria, citosol e meio extracelular e tem como função catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 (reduzido) e H_2O_2 (oxidado) (Figura 1A) utilizando metais de transição como cofatores. O H_2O_2 é uma das ERO mais danosas ao organismo, sendo necessário sua rápida transformação em compostos não danosos (VALKO *et al.*, 2006; DAVIES, 2000). Portanto, o H_2O_2 é reduzido a outros compostos por meio da ação das enzimas CAT e GPx. A CAT

promove redução do H_2O_2 a água e O_2 (Figura 1B) nos peroxissomos, enquanto a GPx utiliza H_2O_2 e GSH como substratos para reduzir o primeiro a água e oxidar o segundo a glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 1C), atuando juntamente com a enzima glutathiona redutase (GR), responsável por reduzir GSSG a GSH (Figura 1D) (DAVIES, 2000; VALKO *et al.*, 2006).

De acordo com o exposto acima, a SOD é uma enzima capaz de reduzir o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual é substrato para as enzimas CAT e GPx. Desta forma, quando células aumentam a atividade da SOD sem aumentar proporcionalmente a atividade das peroxidases, o organismo é submetido à sobrecarga de H_2O_2 (PINHO *et al.*, 2006), podendo resultar na geração de OH^{\cdot} via reação de Fenton (Figura 1E) ou Haber-Weiss (Figura 1F), sendo este altamente danoso ao organismo, uma vez que não há sistema antioxidante endógeno que combata este RL (WINTERBOURN, 1995).

Figura 1 – Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes e reações de Fenton e de Haber-Weiss



Reações catalisadas pela (1) superóxido dismutase, (2) catalase, (3) glutathiona peroxidase e (4) glutathiona redutase. Reações de (5) Fenton e de (6) Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KEHRER, 2000)

Desta forma, a estreita relação entre as enzimas antioxidantes determinam os efeitos fisiológicos e/ou fisiopatológicos dos oxidantes (AMSTAD *et al.*, 1991). O desequilíbrio celular entre as atividades da SOD e da CAT ou da GPx pode

desencadear danos às células. A razão entre a atividade das enzimas SOD e CAT ou GPx pode ser mais importante na avaliação do perfil antioxidante celular do que os níveis absolutos de atividade destas enzimas individualmente (AMSTAD *et al.*, 1991; FULLERTON *et al.*, 1998; PINHO *et al.*, 2006; ZANCHI *et al.*, 2010).

Contudo, conforme descrito anteriormente, excesso de ERO ou incapacidade do sistema antioxidante do organismo pode resultar em estresse oxidativo e consequente oxidação de moléculas celulares (SANTOS *et al.*, 2004). O estresse oxidativo é um mecanismo fortemente relacionado aos efeitos adversos da poluição atmosférica e à patogênese de doenças, sendo importante avaliar o estado redox da população em risco para acompanhamento de saúde, diagnóstico, prognóstico, segurança e eficácia de medicamentos, entre outros (NIKI, 2008). Porém, ERO apresentam meia-vida curta em função de sua rápida ação reativa e, portanto, são encontradas em baixas concentrações *in vivo*, o que explica a extrema dificuldade de sua detecção. A alternativa utilizada para avaliar a ação e a quantidade destes compostos no organismo se dá pela mensuração indireta das ERO, por meio da detecção dos produtos de suas reações com moléculas biológicas (MIWA *et al.*, 2008; GHIO *et al.*, 2012).

Dentre as moléculas biológicas alvo dos RL, os lipídios podem ser oxidados, desencadeando as reações em cadeia da peroxidação lipídica. Os ácidos graxos polinsaturados, componentes de membranas celulares e organelas, podem ser oxidados e formar radicais peroxil (ROO[•]), os quais podem se ligar a um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos polinsaturados e dar início à lipoperoxidação. A peroxidação de lipídios de membranas celulares pode desencadear alterações nestas estruturas, como diminuição da fluidez e aumento da permeabilidade iônica, bem como distúrbios estruturais e funcionais, além de modificação de proteínas e bases de DNA, podendo ocasionar morte celular e progressão de doenças (ABERLO, 2007; MIWA *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2003; NIKI, 2009). As concentrações de produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser utilizadas como biomarcador de estresse oxidativo *in vivo* (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; NIKI, 2008).

Proteínas também podem ser submetidas à ação dos RL, podendo gerar grupos carbonil. O dano às proteínas pode ocorrer por ação direta dos RL ou por danos

secundários, envolvendo a ação de produtos da peroxidação lipídica, como o MDA. Níveis elevados de grupos carbonil em proteínas constituem biomarcadores satisfatórios de dano proteico, estando associados com alterações funcionais em muitas proteínas, como receptores, anticorpos, proteínas de transporte e transdução de sinais e enzimas, podendo desencadear ainda agregação proteica. Além disso, o nível de oxidação de proteínas é dependente do balanço entre pró-oxidantes, antioxidantes e atividades proteolíticas, e um desequilíbrio entre estes fatores podem levar ao aumento e acúmulo de grupos carbonil proteicos (ABERLO, 2007; DALLE-DONE *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004; LEMARECHAL *et al.*, 2006).

Condições oxidantes exigem do organismo estratégias de manutenção do equilíbrio redox. O sangue tem papel central nesta manutenção, uma vez que transporta e redistribui antioxidantes para todo o corpo (STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009), conferindo às proteínas a principal ação antioxidante do plasma. A albumina é o principal antioxidante não-enzimático do plasma e os grupos sulfidril são os principais responsáveis pelos efeitos antioxidantes destas proteínas (EREL, 2004). Pode-se afirmar que a mensuração destes grupos no plasma promove uma reflexão indireta das defesas antioxidantes do organismo e baixos níveis destes grupos sugere prejuízo da defesa antioxidante (LEMARECHAL *et al.*, 2006).

Neste contexto, mensurar grupos carbonil proteicos e sulfidril totais é um importante meio de avaliar a ação dos RL às proteínas (FAURE; LAFOND, 1995). Grupos carbonil e sulfidril parecem constituir também bons marcadores de processos inflamatórios (LEMARECHAL *et al.*, 2006; RENKE *et al.*, 2000). Doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação, como artrite reumatoide (MAHMOUD; ISMAIL, 2011), asma (NADEEM *et al.*, 2003), ou ainda exposição aos poluentes do cigarro (AYCICEC; EREL; KOCYIGIT, 2005) são associadas ao acúmulo de grupos carbonil e diminuição de grupos sulfidril plasmáticos.

Portanto, quando o organismo é desafiado por condições de estresse, como em doenças ou exposição aos poluentes atmosféricos, pode ocorrer desequilíbrio entre as reações redox. Este desequilíbrio pode ser desencadeado pelo aumento da produção de ERO, deficiência do sistema antioxidante, ou ambos, ocasionando estresse oxidativo. Neste cenário, os agentes redutores não conseguem inativar quantidades

suficientes de agentes oxidantes, promovendo perfil celular pró-oxidativo e podendo causar dano celular (VALKO *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

Os metais de transição têm sido os compostos adsorvidos ao MP mais associados aos efeitos adversos deste poluente. Metais de transição como ferro, vanádio, níquel, cromo, cobre e zinco estão entre os mais danosos aos tecidos biológicos pela sua capacidade de gerar ERO, principalmente OH^{*} por meio de reações de Fenton (CHEN; LIPPMANN, 2009).

Os resíduos inorgânicos que permanecem após a oxidação incompleta de materiais contendo carbono, presentes em combustíveis a óleo, contribuem significativamente na constituição do MP urbano e são denominados *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) (GHIO *et al.*, 2002). O ROFA é uma mistura complexa de sulfatos, nitratos e metais, como ferro, vanádio e níquel, estando a maioria presentes em altas concentrações como sais solúveis em água (CHEN; LIPPMANN, 2009). O tamanho aerodinâmico das partículas do ROFA correspondem, principalmente, ao MP_{2,5} (SCHROEDER *et al.*, 1987) e estas partículas podem substituir o MP atmosférico *per se* em estudos de efeito biológico (GHIO *et al.*, 2002; ROBERTS *et al.*, 2003; ZANCHI *et al.*, 2008; DAMIANI *et al.*, 2012; DELFOSSE *et al.*, 2013; HECK *et al.*, 2014).

Os principais mecanismos relacionados aos efeitos tóxicos da exposição ao ROFA são o estresse oxidativo e a inflamação, os quais atuam primeiramente no tecido pulmonar, uma vez que é o primeiro tecido biológico ao entrar em contato com os poluentes atmosféricos (MARCHINI *et al.*, 2014). A alta concentração de metais de transição confere ao ROFA capacidade de induzir dano pulmonar em modelos animais experimentais (GHIO *et al.*, 2002). A exposição aguda a este poluente desencadeou lipoperoxidação no pulmão (PETRY, 2011), ao contrário da exposição crônica, a qual não causou dano lipídico neste tecido (DAMIANI *et al.*, 2012), sugerindo a ocorrência de adaptação ao estresse. Os mecanismos responsáveis por desencadear dano pulmonar não são totalmente compreendidos, mas resultados experimentais sugerem que os metais inalados catalisam reações químicas de Fenton e produzem ERO no pulmão (GHIO *et al.*, 2002). As ERO podem ser facilmente convertidas em RL, apresentando alto potencial de dano celular em tecidos biológicos, pois podem desencadear reações moleculares de forma indiscriminada, levando a oxidação e

consequente inativação das moléculas alvo. Quanto maior a quantidade destas reações no pulmão, maior será a extensão do dano celular (KELLY, 2003).

A suscetibilidade pulmonar ao dano oxidativo é altamente dependente da habilidade do sistema antioxidante em neutralizar a ação oxidativa dos RL. Normalmente, as ERO são removidas rapidamente antes de causar disfunção ou morte celular. Porém, se a ação oxidante dos RL exceder a capacidade antioxidante do organismo, estas espécies reativas podem sobrecarregar ou inativar o sistema antioxidante de defesa. A consequência fisiopatológica deste quadro é a inflamação (COMHAIR; ERZURUM, 2002). Rhoden e colaboradores (2004) demonstraram que oxidantes são mediadores críticos da resposta inflamatória inerente à exposição ao MP, uma vez que a intervenção com antioxidante impediu o desenvolvimento de processo inflamatório em modelo experimental de poluição. Além disso, os mesmos autores identificaram o $O_2^{\cdot-}$ como importante mediador destes processos inflamatórios causados por MP (RHODEN; GHELFI; GONZÁLEZ-FLECHA, 2008).

Evidências experimentais complementam ainda que ERO no pulmão promovem sinalização celular responsável por ativar fatores de transcrição, como o fator nuclear κB (NF- κB) e o ativador de proteína-1 (AP-1), os quais desencadeiam a expressão de proteínas envolvidas na resposta inflamatória, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, resultando no recrutamento e ativação de leucócitos e ocasionando inflamação pulmonar (GHIO *et al.*, 2002).

Além disso, a poluição decorrente de indústrias e transporte veicular tem demonstrado causar importantes efeitos adversos relacionados a doenças respiratórias. A exposição de macrófagos alveolares ao ROFA *in vitro* reduziu a produção de mediadores inflamatórios por estas células e prejudicou a capacidade das mesmas em destruir *Mycobacterium phlei*, demonstrando que este poluente modifica a resposta imunológica inata pulmonar (DELFOSSÉ; GIOFFRÉ; TASAT, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos *in vivo*, demonstrando que a exposição ao ROFA antes da infecção com *Mycobacterium phlei* ou *Listeria monocytogenes* reduziu o influxo de células imunes ao pulmão e diminuiu a geração de mediadores de defesa, como $O_2^{\cdot-}$, TNF- α , IL-6 e óxido nítrico, sugerindo que a

exposição ao ROFA pode suprimir a habilidade pulmonar de defesa contra infecções (ANTONINI *et al.*, 2002; DELFOSSE; TASAT; GIOFFRÉ, 2013).

Os efeitos adversos desencadeados pelos metais de transição adsorvidos às partículas do ROFA podem ser liberados do pulmão para a circulação sistêmica, podendo atingir outros tecidos e tipos celulares (WALLENBORN *et al.*, 2007). Após 24 horas da instilação de ROFA foi encontrado aumento de fibrinogênio no sangue e após três dias de exposição houve aumento na coagulação sanguínea, ambas alterações consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GARDNER; LEHMANN; COSTA, 2000; PETRY, 2011). A instilação crônica de ROFA demonstrou alterações oxidativas no coração (DAMIANI *et al.*, 2012) e também ocasionou efeitos adversos no cérebro, constatados pela ocorrência de peroxidação lipídica em estruturas do sistema nervoso central e alterações comportamentais (ZANCHI *et al.*, 2008).

A capacidade de desencadear estresse oxidativo, inflamação e contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças caracteriza a exposição aos poluentes atmosféricos, inclusive ao ROFA, como uma condição de estresse celular (MARCHINI *et al.*, 2014; DOMINICI *et al.*, 2006; DELFOSSE; TASAT; GIOFFRÉ, 2013; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003). Esta condição desencadeia no organismo a resposta celular ao estresse, mecanismo que promove o aumento da expressão de proteínas de choque térmico, essencial à sobrevivência das células e do organismo com um todo (GUISBERT; MORIMOTO, 2013).

1.3 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Uma das primeiras definições de estresse é descrita por Hans Selye, demonstrando que organismos expostos a agentes nocivos (físicos, químicos, biológicos ou psicológicos) desencadeiam uma síndrome, a qual apresenta sintomas independentes da natureza do agente danoso ou farmacológico, caracterizada como resposta ao dano. O estresse é definido como uma resposta não específica do corpo a qualquer exigência feita sobre ele para se adaptar (SELYE, 1936; SELYE, 1976).

É essencial à sobrevivência que os organismos vivos sejam hábeis a perceber e responder a diversas formas de estresse fisiológico e ambiental, além de responder

precisamente ao tipo e nível de dano ocasionado. Adaptações celulares ao estresse ocorrem por meio de mecanismo celular altamente conservado pela evolução, denominado resposta celular ao estresse (*cellular stress response*) (GUISBERG; MORIMOTO, 2013; AKERFELT; MORIMOTO; SISTONEN, 2010; LOCKE; NOBLE, 2002).

Esta resposta foi identificada primeiramente por Ritossa (1962) por meio de temperatura elevada, sendo assim inicialmente denominada resposta ao choque térmico (*heat shock response*). O autor percebeu espessamento cromossomal em células de glândulas salivares de larvas de *Drosophila busckii* após aumento acidental de temperatura, tendo sugerido relação entre espessamento cromossomal e atividades metabólicas específicas. Posteriormente, este novo padrão de espessamento cromossomal foi relacionado com síntese proteica (TISSIÈRES; MITCHELL; TRACY, 1974).

A resposta celular ao estresse promove indução de expressão gênica. Em células eucariontes esta resposta requer ativação e translocação nuclear de um ou mais fatores de transcrição, denominados fator de transcrição de choque térmico (*heat shock factor*; HSF). Os HSFs controlam a expressão de genes que codificam proteínas denominadas proteínas de estresse (*stress proteins*) ou proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) (MORIMOTO, 1993; SANTORO, 2000; LOCKE, NOBLE, 2002).

Em células sob condições basais, o HSF encontra-se tanto no citoplasma quanto no núcleo em forma monomérica inativa, sem ligação no DNA. Entretanto, sob condições de estresse, este fator sofre trimerização e acumula-se no núcleo, aumentando sua afinidade de ligação ao DNA e ligando-se a uma sequência de nucleotídeos denominada elemento de choque térmico (*heat shock element*), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as proteínas de choque térmico, resultando em um alto nível de transcrição destes genes (MORIMOTO, 1993; MEYER; SILVA, 1999; HO; WESTWOOD, 2002).

Portanto, por meio de regulação direta de seus genes alvo, HSFs contribuem para múltiplos processos fisiológicos normais e patológicos. Mamíferos expressam múltiplos HSFs: HSF1, HSF2, HSF3 e HSF4. Foram isolados HSF1, HSF2 e HSF3 de camundongos e HSF1, HSF2 e HSF4 de humanos, tendo sido demonstrado 90 e 95%

de homologia entre estas espécies para HSF1 e HSF2, respectivamente. O HSF1 foi originalmente reconhecido como o principal regulador sensível ao estresse, contribuindo para a integridade celular e o desenvolvimento de termotolerância. O mesmo HSF é constitutivamente expresso em todos os tecidos e tipos celulares e mantém-se inativo na ausência de estresse. Estudos recentes demonstram que HSF2 é capaz de modular a expressão de genes de proteínas de choque térmico mediadas pelo HSF1, sendo também expresso em todas as células. Do contrário, a expressão de HSF4 não apresenta papel na resposta ao choque térmico e parece ser específica ao coração, músculo esquelético e cérebro. O HSF3 de camundongos é o mais recentemente identificado, o qual participa da resposta ao choque térmico, porém não apresenta ligação direta com os demais HSFs (AKERFELT; MORIMOTO; SISTONEN, 2010; HO; WESTWOOD, 2002).

Neste contexto, as proteínas de choque térmico são multifuncionais e envolvidas em muitos processos fisiológicos. Desempenham função essencial à sobrevivência das células, tanto em condições basais quanto em situações de estresse. Estão envolvidas na manutenção do ciclo celular, na regulação da proliferação celular e da expressão gênica e no desenvolvimento de processos a partir de sinalização molecular, bem como organização da citoarquitetura ao ligar e estabilizar elementos do citoesqueleto. Além disso, as proteínas de choque térmico desempenham função regulatória no envelhecimento e na longevidade celular e direcionam células a apoptose ou a necrose. Durante e após situações de estresse a expressão destas proteínas é aumentada, desencadeando citoproteção e defesa fisiológica contra os efeitos deletérios do estresse celular, podendo promover tolerância ao estresse (RICHTER-LANDSBERG, 2007).

Estas proteínas permaneceram altamente conservadas durante a evolução das espécies. Podem ser encontradas no simples procarionte, bem como no mais complexo organismo multicelular, sugerindo que as proteínas de choque térmico tenham exercido função essencial para a sobrevivência ao longo da evolução (WU, 1995; VAN EDEN; YOUNG, 1996).

Todas as células submetidas aos estresses ambientais elevam rapidamente a concentração de proteínas de choque térmico. Temperaturas entre 5 e 10 °C maiores

que a temperatura ótima para o crescimento celular têm sido o estresse mais amplamente estudado, dando origem à denominação proteínas de choque térmico. No entanto, diferentes formas de estresse podem elevar o conteúdo intracelular destas proteínas, como oxidantes, metais de transição, análogos de aminoácidos, ausência de glicose, hipóxia, microrganismos patogênicos, câncer, entre outros, sendo também denominadas proteínas de estresse (ELLIS, 1996; JOLY *et al.*, 2010).

As proteínas de choque térmico atuam como chaperonas¹ moleculares. A maioria das proteínas devem estar estruturadas em conformação tridimensional para desempenhar suas atividades funcionais. No ambiente intracelular, proteínas recém sintetizadas são alvos de alterações no dobramento e de agregação, podendo resultar em espécies tóxicas à célula. Contudo, as células apresentam uma rede complexa de chaperonas moleculares com mecanismos eficientes para promover o correto dobramento proteico e prevenir agregação. Pelo fato de proteínas serem altamente dinâmicas, o acompanhamento constante de chaperonas faz-se necessário para manter a homeostase proteica, também denominada proteostase (HARTL; MARTIN, 1995; HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011).

Desta forma, as proteínas de choque térmico participam da síntese, dobramento e processos de transporte e translocação de proteínas. Auxiliam no correto dobramento de proteínas nascentes ou incorretamente dobradas, ou ainda podem se ligar e estabilizar conformações instáveis de outras proteínas, prevenindo agregação e desnaturação proteica por meio destes processos. Além disso, possibilitam o transporte de proteínas entre compartimentos celulares, o controle da alteração entre conformações ativas e inativas, bem como o controle da ligação e liberação de substratos nas proteínas. As proteínas de choque térmico também cooperam com o sistema proteassomo-ubiquitina, contribuindo na manutenção da qualidade das proteínas (HENDRICK; HARTL, 1993; JOLY *et al.*, 2010; RICHTER-LANDSBERG, 2007).

Além da clássica ação chaperona, as proteínas de choque térmico intracelulares desencadeiam importante função antiinflamatória por meio da inibição do NF- κ B. O NF-

¹Chaperona: proteína celular que interage, estabiliza ou auxilia outra proteína a adquirir sua conformação funcional ativa sem estar presente em sua estrutura final.

κ B é um fator de transcrição eucariótico que se apresenta, normalmente, ligado a proteínas inibitórias da família I κ B (tipicamente I κ B α) no citoplasma, sendo induzido por muitos estímulos patogênicos, como infecções, radiação UV e citocinas inflamatórias. Ativação de NF- κ B requer a fosforilação e a degradação de I κ B α , permitindo translocação do NF- κ B ao núcleo, onde se liga a sítios específicos κ B e codifica genes de proteínas de sinalização inflamatória e imunológica, como a citocina fator de necrose tumoral (TNF) e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO) (HECK, 2011; MORIMOTO; SANTORO, 1998).

A função das proteínas de choque térmico sob condições de estresse vai além de sua ação intracelular chaperona e antiinflamatória. Estas proteínas podem ser exportadas por mecanismo de secreção celular ou liberadas por necrose, sendo detectadas no ambiente extracelular e capazes de ativar vias sinalizadoras pró-inflamatórias e imunológicas. A exportação destas proteínas parece ser um fenômeno complexo que engloba vias alternativas de secreção celular, classificadas como vias secretórias não clássicas, uma vez que não estão relacionadas a via secretória clássica Retículo Endoplasmático-Complexo de Golgi (DE MAIO, 2011).

As proteínas de choque térmico extracelulares atuam como indicadores de condições de estresse. Após a liberação ao meio extracelular, estas proteínas podem se ligar à superfícies celulares e iniciar cascatas de transdução de sinais, bem como realizar o transporte de antígenos. Muitos dos efeitos das proteínas de choque térmico extracelulares são mediados por meio de receptores de superfície celular, como receptores dos tipos Toll 2 (TLR2) e Toll 4 (TLR4), CD40, CD91, CCR5, LOX-1 e SREC-1. Esta diversidade de receptores permite que estas proteínas liguem-se a diferentes tipos celulares e realizem funções multicelulares complexas, particularmente em células imunes e neurônios (CALDERWOOD *et al.*, 2007; DE MAIO, 2011).

As proteínas de choque térmico de mamíferos têm sido classificadas em cinco famílias, de acordo com o peso molecular em quilodaltons (kDa): proteínas de choque térmico de 110 kDa (HSP110), proteínas de choque térmico de 90 kDa (HSP90), proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), proteínas de choque térmico de 60 kDa (HSP60) e pequenas proteínas de choque térmico. Cada família é composta por proteínas expressas constitutivamente ou reguladas indutivamente, encontradas em

diferentes compartimentos intracelulares, como citosol, núcleo e organelas (JOLY *et al.*, 2010).

Dentre as proteínas de choque térmico, destacam-se as proteínas da família HSP70, pois apresentam-se mais relevantes, conservadas e em maior concentração nos eucariontes (HIGHTOWER; LI, 1994; JOLY *et al.*, 2010). Estas proteínas são essenciais ao organismo, uma vez que a sua ação chaperona molecular assiste ao dobramento proteico em todas as células (HU; MAYER; TOMITA, 2006). Apresentam também importante ação antiinflamatória a partir da inibição do NF- κ B, bem como ação antiapoptótica por meio de diferentes mecanismos (RICHTER-LANDSBERG, 2007).

Dentre os membros desta família, é possível citar a forma constitutiva de 73 kDa (HSC70, HSP73); a forma induzível de 72 kDa (HSP70, HSP72); a forma regulada por glicose, localizada no retículo endoplasmático, de 78 kDa (GRP78, BiP – *binding immunoglobulin protein*); e a forma mitocondrial de 75 kDa (GRP75). Contudo, a família HSP70 é principalmente representada pelas formas HSP73 e HSP72. Todos os membros da HSP70 apresentam atividade chaperona e ciclo de reação dependente de ATP (ciclo ATPase) (MAYER; BUKAU, 2005; ASEA, 2005; RICHTER-LANDSBERG, 2007; HECK *et al.*, 2011).

Todas as proteínas da família HSP70 apresentam a mesma estrutura. Elas são compostas por aminoácidos, os quais formam um domínio ATPase N-terminal de 45 kDa, um domínio de ligação de peptídeo de cerca de 15 kDa e um domínio C-terminal de, aproximadamente, 10 kDa, estando o último envolvido na ligação de co-chaperona e prováveis funções adicionais (ERBSE; MAYER; BUKAU, 2004; KAMPINGA; CRAIG, 2010).

As atividades exercidas pela HSP70 parecem ser baseadas na sua propriedade de interagir com segmentos peptídicos hidrofóbicos das proteínas em modo controlado por ATP. O ciclo ATPase da HSP70 é regulado por chaperonas da família HSP40 (também conhecidas como DnaJ) e fatores trocadores de nucleotídeo (NEF) (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). O ciclo ATPase da HSP70 consiste de alternância entre a ligação de ATP (baixa afinidade pelo substrato) e ADP (alta afinidade pelo substrato) (MAYER; BUKAU, 2005). A hidrólise do ATP a ADP é fortemente acelerado pela HSP40, estabilizando a ligação com o peptídeo (substrato). A HSP40 também

interage diretamente com polipeptídeos desdobrados e podem recrutar HSP70 para substratos proteicos. Após hidrólise do ATP, um NEF liga-se ao domínio ATPase da HSP70 e catalisa a troca de ADP por ATP, resultando na liberação do substrato em correta conformação (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011).

As proteínas da família HSP70 são homólogas e codificadas por multigenes (SON *et al.*, 1999). Atualmente sabe-se da existência de, ao menos, treze genes que codificam HSP70 (HSPA) em humanos – HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA9, HSPA12A, HSPA12B, HSPA13, HSPA14 (BROCCHIERI; MACARIO; MACARIO, 2008; KAMPINGA *et al.*, 2009).

O amplo espectro das funções celulares da HSP70 é inerente a alguns fatores, como a amplificação e a diversificação dos genes da HSP70 durante a evolução, tendo gerado chaperonas especializadas; o recrutamento seletivo de co-chaperonas pela HSP70 para exercer funções celulares específicas, como a HSP40; bem como a cooperação da HSP70 com outros sistemas de chaperonas para ampliar seu espectro de atividade (MAYER; BUKAU, 2005), como a interação HSP70-HSP90, importante para a maturação final de alguns receptores e fatores de transcrição (KAMPINGA; CRAIG, 2010). A interação entre HSP70, co-chaperonas e outras chaperonas constituem uma maquinaria de dobramento proteico eficaz e essencial para a protease celular (MAYER; BUKAU, 2005).

O efeito citoprotetor da HSP70 também está relacionado a sua habilidade em inibir a apoptose. A HSP70 pode exercer este efeito por meio da interação direta com um ou mais membros do complexo apoptossomo (BEERE *et al.*, 2000). Além disso, a HSP72 tem demonstrado inibir a apoptose por mecanismos distintos e em diferentes tipos celulares. Esta proteína pode prevenir a formação de apoptossomo ativo por ligação direta ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1) em condições *in vitro*, inibir a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, suprimir atividade de uma proteína cinase ativada pelo estresse – c-Jun N-terminal kinase (JNK), bem como ligar-se ao fator indutor de apoptose (AIF), outro fator apoptótico liberado da mitocôndria, prevenindo a condensação da cromatina e morte celular (GUPTA *et al.*, 2010).

A HSP70 intracelular, particularmente a HSP72, pode ser liberada de muitos tipos celulares, via mecanismo secretor ativo ou necrose, e ser encontrada no meio

extracelular (eHSP70) (HUNTER-LAVIN *et al.*, 2004; JOHNSON; FLESHNER, 2006; MAMBULA *et al.*, 2007), onde atua como potente citocina, promovendo efeitos celulares regulatórios (ASEA *et al.*, 2000), como sinalização celular em respostas inflamatórias e imunológicas (MAMBULA *et al.*, 2007). Sugere-se que a secreção ativa de HSP70 assista células próximas menos hábeis a sintetizar suas próprias HSP70 (GUZHOVA *et al.*, 2001).

Por estimular a liberação ou agir como citocina pró-inflamatória que ativa células imunes efectoras (MOSELEY, 2000), a eHSP70 apresenta propriedade moduladora das respostas imunes inata e adaptativa (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). A eHSP70 atua como citocina em monócitos humanos, desencadeando o aumento da expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (ASEA *et al.*, 2000), capazes ainda de serem liberadas de linfócitos T auxiliares e linfócitos B, bem como alterar o fenótipo de linfócitos T auxiliares, tornando-os mais citotóxicos e com produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

A eHSP70 contribui para o reconhecimento celular de perigo, auxiliando na destruição de células infectadas ou tumorais, bem como no reconhecimento de perigo proveniente de elementos estranhos ao organismo. Para tanto, estas proteínas medeiam a captação e a apresentação de peptídios associados à HSP70 ao complexo de histocompatibilidade principal de células apresentadoras de antígenos; atuam como sinal de perigo endógeno, indicando estresse celular e dano tecidual para o sistema imune; além de ligarem-se a moléculas de padrão molecular associado à patógeno (PAMP) e modularem a sinalização de TLRs induzidos por PAMP (OSTERLOH; BRELOER, 2008).

A partir das informações relatadas, é evidente a distinção funcional da HSP70 de acordo com sua localização: intra ou extracelular (ASEA, 2003). Enquanto a HSP70 intracelular atua como citoprotetora pelas suas propriedades chaperona, antiinflamatória e antiapoptótica, a eHSP70 atua como ou estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, sinaliza condição de perigo às células e modula o sistema imunológico (ASEA *et al.*, 2000). Desta forma, evidências clínicas e experimentais sugerem que baixos níveis de eHSP70 plasmática estão relacionados com saúde e longevidade (TERRY *et al.*, 2004; TERRY *et al.*, 2006) e altos níveis tem sido

relacionados com doenças (YEH *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; GELAIN *et al.*, 2011) e danos ao organismo sob condições de estresse (RUELL *et al.*, 2006), inclusive exposição aos poluentes atmosféricos (YANG, 2007; WANG *et al.*, 2010). Estes achados evidenciam o potencial da eHSP70 como biomarcador de condições adversas ao organismo (BIERKENS, 2000).

A exposição aos poluentes atmosféricos, especialmente ao MP, induz expressão de HSP70 *in vitro* e, cronicamente, *in vivo*. Os estudos *in vitro* relacionam o aumento do conteúdo de HSP70 com proteção e sobrevivência celular (GUALTIERI *et al.*, 2008; GLOWALA *et al.*, 2001), além de demonstrar aumento do conteúdo de HSP70 no meio extracelular e ausência de eHSP70 em presença de antioxidantes, sugerindo que esta proteína pode atuar como mediador inflamatório e contribuir para o desenvolvimento dos efeitos adversos inerentes ao MP (RAMAGE; GUY, 2004). Exposição crônica *in vivo* ao MP demonstrou aumentar o nível de eHSP70 no plasma, sugerindo que a mesma possa contribuir para disfunção vascular e doenças cardiovasculares (KIDO *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo é o mecanismo central pelo qual a exposição ao MP desencadeia dano celular, condições de doença e mortalidade (GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012; DALLE-DONE *et al.*, 2003; LODOVICI, BIGAGLI, 2011) e tem sido demonstrado forte relação entre estresse oxidativo e o aumento da expressão de HSP70. Esta relação pode ser explicada, em parte, pelo fato de ERO ativarem cinases e fatores de transcrição (JAK/STAT) (SIMON *et al.*, 1998) que modulam a expressão de HSP70 (MADAMANCHI *et al.*, 2001). Desta forma, a HSP70 é um componente molecular que reconhece alterações redox no ambiente intracelular eucariótico, desencadeando a primeira linha de defesa contra dano oxidativo (MADAMANCHI *et al.*, 2001; KALMAR; GREENSMITH, 2009; GOLLI-BENNOUR; BACHA, 2011).

Desta forma, o aumento da expressão de HSP70 é uma proteção complementar contra estresse oxidativo celular quando o sistema de defesa antioxidante não consegue combater eficientemente à ação de ERO (SMOLKA *et al.*, 2000). Por outro lado, o estresse oxidativo em ambiente extracelular, como o plasma, também modula o aumento dos níveis de eHSP70, porém, esta associação tem demonstrado agravar ou ser responsável por efeitos deletérios ao organismo (GELAIN *et al.*, 2011). Este quadro

pode ser explicado pelo fato de um ambiente pró-oxidante ser capaz de oxidar e desencadear alterações estruturais na molécula de HSP70, resultando em prejuízo funcional, especialmente na sinalização de perigo (GRUNWALD *et al.*, 2014).

Muitos estudos têm demonstrado a relação entre a expressão de HSP70 em células do sistema imune e a sinalização de condição de estresse celular e do organismo como um todo. A exposição ao MP desencadeia aumento da expressão de HSP70 em macrófagos alveolares, sugerindo ocorrer liberação desta proteína do pulmão para a circulação e contribuir para o desenvolvimento de efeitos adversos (KIDO *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado ainda que linfócitos liberam continuamente HSP70 para a circulação e que condições de estresse resultam em rápido e acentuado aumento desta liberação (HUNTER-LAVIN *et al.*, 2004). Tanto o conteúdo de HSP70 circulante quanto o conteúdo desta proteína em linfócitos diminui com o passar da idade, sugerindo que ambas variáveis podem estar relacionadas com condições de estresse decorrentes do envelhecimento, amplamente relacionadas aos estressores ambientais, como exposição aos poluentes atmosféricos (JIN *et al.*, 2004a). Além disso, sugere-se que altos níveis de HSP70 em linfócitos durante o período inicial de estresse seja indicativo de dano ao organismo e, em estágios tardios de estresse, o aumento continuado desta proteína indica permanência de estímulo nocivo, podendo marcar mau prognóstico de doenças (JIN *et al.*, 2004b) ou agravos à saúde por outras condições de estresse, como exposição à poluição atmosférica (WANG *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

A poluição atmosférica é um problema global de saúde (WHO, 2014), uma vez que grande parte da população mundial é exposta diariamente aos poluentes do ar, especialmente ao MP. A exposição ao MP tem sido fortemente associada a efeitos adversos ao organismo e a progressão de doenças, principalmente por meio de estresse oxidativo (SORENSEN *et al.*, 2003). Neste contexto, muitos estudos foram desenvolvidos buscando a compreensão dos efeitos do MP no sistema cardiopulmonar, pois são os primeiros tecidos acometidos por esta exposição. Por outro lado, a capacidade do MP de atingir o organismo de forma sistêmica evidencia a necessidade de novos estudos que avaliem possíveis alterações em outros tecidos, como tecidos imunológicos, importantes na defesa do organismo contra agentes agressores externos.

Compreender os mecanismos citotóxicos da poluição atmosférica no organismo é imprescindível no estabelecimento de estratégias efetivas que visem prevenir ou minimizar os efeitos nocivos à saúde (SCHROEDER *et al.*, 1987). Dentre estas estratégias, a identificação de biomarcadores de risco e de efeitos adversos dos poluentes do ar é importante e pertinente, sendo possível identificar indivíduos suscetíveis e prevenir danos à saúde (NEL, 2005).

Como proposta de biomarcador, neste estudo propomos investigar o conteúdo de HSP70 em tecidos linfoides e no plasma de animais expostos ao ROFA. Enquanto a HSP70 intracelular atua na manutenção da proteostase, no ambiente extracelular é sinal de alerta ao organismo (GUISBERG; MORIMOTO, 2013; DE MAIO, 2011). Alterações do conteúdo de HSP70 circulante e de células imunológicas, como linfócitos, têm demonstrado forte relação com condições adversas ao organismo (HUNTER-LAVIN *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2004a; JIN *et al.*, 2004b; YANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010). Portanto, avaliar a HSP70 e a sua relação com o estresse oxidativo pode significar, neste contexto, a identificação de danos subclínicos causados pela exposição ao ROFA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar se a instilação aguda de ROFA causa alteração no conteúdo de HSP70 no plasma e em tecidos linfoides e se estão associados com alterações no estado redox.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar o conteúdo de HSP70 no plasma e em tecidos linfoides (linfonodos mesentéricos, timo e baço) após instilação aguda de ROFA;

Mensurar variáveis de estado redox (grupos carbonil, peroxidação lipídica, grupos sulfidril e atividade das enzimas SOD e CAT) após instilação aguda de ROFA;

Identificar se a instilação aguda de ROFA altera as quantidades basais total e diferencial de leucócitos circulantes.

REFERÊNCIAS

ABERLO, D. Oxigen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed, New York: Oxford University Press, p. 1-29, 2007.

ADACHI, M. *et al.* Oxidative stress impairs the heat stress response and delays unfolded protein recovery. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7719, 2009.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 545-555, 2010.

AMSTAD, P. *et al.* The balance between CuZn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. **Biochemistry**, v. 30, n. 38, p. 9305-9313, 1991.

ANALITIS, A. *et al.* Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. **Epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 230-233, 2006.

ANTONINI, J. M. *et al.* Residual oil fly ash increases the susceptibility to infection and severely damages the lungs after pulmonary challenge with a bacterial pathogen. **Toxicological Sciences**, v. 70, n. 1, p. 110-119, 2002.

ASEA, A. Chaperokine-Induced Signal Transduction Pathways. **Exercise Immunology Review**, v. 9, p. 25-33, 2003.

ASEA, A. Stress Proteins and Initiation of Immune Response: Chaperokine activity of Hsp72. **Exercise Immunology Review**, v. 11, p. 34-45, 2005.

ASEA, A. *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 435-442, 2000.

ASIMOV, I. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed, New York: Oxford University Press, p. 187-267, 2007.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**, v. 47, n. 6, p. 635-639, 2005.

BEERE, H. M. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 469-475, 2000.

- BELL, M. L.; DAVIS, D. L.; FLETCHER, T. A retrospective assessment of mortality from the london smog episode of 1952: The role of influenza and pollution. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 1, p. 6-8, 2004.
- BIERKENS, J. G. E. A. 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology**, 153, n. 1-3, p. 61-72, 2000.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Qualidade do ar**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar>.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 3 de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar (PRONAR). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 15937-15939, 1990.
- BROCCHIERI, L.; MACARIO, E. C.; MACARIO, A. J. L. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 19, 2008.
- BROOK, R. D. *et al.* Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2655–2671, 2004.
- CALDERWOOD, S. K. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3689-3694, 2007.
- CHEN, B.; KAN, H. Air pollution and population health: A global challenge. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 13, n. 2, p. 94-101, 2008.
- CHEN, L. C.; LIPPMANN, M. Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health. **Inhalation Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2009
- COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.
- DALLE-DONE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.
- DAMIANI, R. M. *et al.* Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 7, p. 533-539, 2012.
- DAVIES, K.J.A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279-289, 2000.

DE MAIO, A. 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**, v. 16, n. 3, p. 235-249, 2011.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DELFOSSÉ, V. C.; GIOFFRÉ, A. K.; TASAT, D. R. Low levels of residual oil fly ash (ROFA) impair innate immune response against environmental mycobacteria infection *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 1001-1006, 2012.

DELFOSSÉ, V. C.; TASAT, D. R.; GIOFFRÉ, A. K. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. **Environmental Toxicology**, 2013, DOI: 10.1002/tox.21936.

DOMINICI, F. *et al.* Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. **The Journal of the Medical American Association**, v. 295, n. 10, p. 1127-1134, 2006.

DONALDSON, K. The biological effects of coarse and fine particulate matter. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 5, p. 313-314, 2003.

DOOLEY, E. E. Fifty years later: Clearing the air over the London smog. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 12, p. A 748, 2002.

ELLIS, R. J. Stress proteins as molecular chaperones. In: VAN EDEN, W.; YOUNG, D. B., ed. **Stress proteins in medicine**. New York: Marcel Dekker, p. 1-26, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. **Particle Pollution and Your Health**. Office of Air and Radiation, 2003. Disponível em: www.epa.gov/air.

ERBSE, A.; MAYER, M. P.; BUKAU, B. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. **Biochemical Society Transaction**, v. 32, n. Pt 4, p. 617-621, 2004.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; GUOYAO, W. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FAURE, P.; LAFOND, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**, p. 237-248, 1995.

- FIGUEIREDO, C. *et al.* Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 3008-3016, 2009.
- FULLERTON, H. J. *et al.* Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 3, p. 357-364, 1998.
- GARDNER, S. Y.; LEHMANN, J. R.; COSTA, D. L. Oil fly ash-induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. **Toxicological Science**, v. 56, n. 1, p. 175-180, 2000.
- GELAIN, D. P. *et al.* Serum heat shock protein 70 levels oxidant status and mortality in sepsis. **Schock**, v. 35, n. 5, p. 466-470, 2011.
- GHIO, A. J.; CARRAWAY, M. S.; MADDEN, M. C. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells tissues and living systems. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-21, 2012.
- GHIO, A. J. *et al.* Biologic effects of oil fly ash. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, Suppl 1, p. 89-94, 2002.
- GIUSTARINI, D. *et al.* Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.
- GLOWALA, M. *et al.* HSP70 overexpression increases resistance of V79 cells to cytotoxicity of airborne pollutants but does not protect the mitotic spindle against damage caused by airborne toxins. **Toxicology**, v. 170, n. 3, p. 211-219, 2001.
- GOLLI-BENNOUR, E. E.; BACHA, H. 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. **Toxicology**, v. 287, n. 1-3, p. 1-7, 2011.
- GRUNWALD, M. S. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. **Cell Stress & Chaperones**, 2014, DOI: 10.1007/s12192-014-0516-5.
- GUALTIERI, M. *et al.* Organic compounds in tire particle induce reactive oxygen species and heat-shock proteins in the human alveolar cell line A549. **Environment International**, v. 34, n. 4, p. 437-442, 2008.
- GUISBERT, E.; MORIMOTO, R. I. The regulation and function of the heat shock response. In: MORIMOTO, R. I.; CHRISTEN, Y. (Ed.). **Protein Quality Control in Neurodegenerative Diseases**, Research and Perspectives in Alzheimer's Disease. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 1-18, 2013, DOI 10.1007/978-3-642-27928-7_1.

GUPTA, S. *et al.* HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1a-XBP1 signaling through a physical Interaction. **PLoS Biology**, v. 8, n. 7, p. e1000410, 2010.

GUZHOVA, I. *et al.* In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. **Brain Research**, v. 914, n. 1-2, p. 66-73, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed, New York: Oxford University Press, 851 p., 2007.

HARRISON, R. M.; YIN, J. Particulate matter in the atmosphere: Which particle properties are important for its effects on health? **The Science of the Total Environment**, v. 249, n. 1-3, p 85-101, 2000.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

HARTL, F. U.; MARTIN, J. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 1, p. 92-102, 1995.

HECK, T. G. **Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de Hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício**. 2011. 154 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HECK, T. G. *et al.* Residual oil fly ash (ROFA) inhalation promotes lung and heart oxidative stress without hemodynamic effects in exercising rats. **Journal of Exercise Physiology online**, v. 17, n. 1, p. 78-89, 2014, ISSN 1097-9751.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 349-384, 1993.

HIGHTOWER, L. E.; LI, T. Structure and function of the mammalian hsp70 family. In: MAYER, J.; BROWN, I. (Ed.). **Heat Shock Proteins in the Nervous System**. San Diego: Academic Press, p. 1-30, 1994.

HO, J. S. L.; WESTWOOD, T. Transcriptional regulation of the mammalian heat shock genes. In: LOCKE, M.; NOBLE, E. G. (Ed.). **Exercise and stress response**. Boca Raton: CRC Press, p. 13-41, 2002.

HU, B.; MAYER, M. P.; TOMITA, M. Modeling Hsp70-mediated protein folding. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 2, p. 496-507, 2006.

- HUNTER-LAVIN, C. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 324, n. 2, p. 511-517, 2004.
- JIN, X. *et al.* Correlation of lymphocyte heat shock protein 70 levels with neurologic deficits in elderly patients with cerebral infarction. **The American Journal of Medicine**, v. 117, n. 6, p. 406-411, 2004b.
- JIN, X. *et al.* Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: A study in the normal chinese population. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 1, p. 69-75, 2004a.
- JOHNSON, J. D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 3, p. 425-434, 2006.
- JOLY, A. L. *et al.* Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 3, p. 238-247, 2010.
- KALMAR, B.; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 310-318, 2009.
- KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010.
- KAMPINGA, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress & Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 105-111, 2009.
- KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 2, p. 362-367, 2008.
- KEHRER, J. P. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.
- KELLY, F. J. Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 8, p. 612-616, 2003.
- KIDO, T. Diesel exhaust inhalation induces heat shock protein 70 expression in vivo. **Inhalation Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 593–601, 2011.
- KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.
- LEMARECHAL, H. *et al.* Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. **Clinica Chimica Acta**, v. 372, n. 1-2, p 147-153, 2006.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G. **Exercise and stress response**. Boca Raton: CRC Press, 226 p., 2002.

LODOVICI, M.; BIGAGLI, E. Oxidative stress and air pollution exposure. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.

MADAMANCHI, N. R. *et al.* Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 3, p. 321-326, 2001.

MAHMOUD, A. A.; ISMAIL, M. A. Serum protein carbonyl content total thiol and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of American Science**, v. 7, n. 5, p. 683-686, 2011.

MAMBULA, S. S. *et al.* Mechanisms for Hsp70 secretion: Crossing membranes without a leader. **Methods**, v. 43, n. 3, p. 168-175, 2007.

MARCHINI, T. *et al.* Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to residual oil fly ash. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, n. 2, p. 274–282, 2014.

MATÉ, T. *et al.* Short-term effect of fine particulate matter (PM_{2.5}) on daily mortality due to diseases of the circulatory system in Madrid (Spain). **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 23, p. 5750–5757, 2010.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MIRANDA, R. M. *et al.* Urban air pollution: a representative survey of PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Quality, Atmosphere & Health**, v. 5, n. 1, p. 63-77, 2012.

MIWA, S.; MULLER, F. L.; BECKMAN, K. B. The basics of oxidative biochemistry. In: **Oxidative Stress in Aging: From model systems to human diseases**. Totowa: Human Press, p. 11-35, 2008.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v. 259, n. 5100, p. 1409-1410, 1993.

- MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 833-838, 1998.
- MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. **Immunopharmacology**, v. 48, n. 3, p. 299-302, 2000.
- MUKHOPADHYAY, I. *et al.* Heat Shock Response: hsp70 in Environmental Monitoring. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 249-254, 2003.
- NADEEM, A. *et al.* Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 1, p. 72-78, 2003.
- NEL, A. Air pollution-related illness: Effects of particles. **Science**, v. 308, n. 5723, p. 804-806, 2005.
- NELIN, T. D. *et al.* Direct and indirect effects of particulate matter on the cardiovascular system. **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 293-299, 2012.
- NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 5, p. 469-484, 2009.
- NIKI, E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. **BioFactors**, v. 34, n. 2, p. 171-180, 2008.
- OSTERLOH, A.; BRELOER, M. Heat shock proteins: Linking danger and pathogen recognition. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 197, n. 1, p. 1-8, 2008.
- PETRY, M. R. **Análise dos efeitos pulmonares e cardiovasculares da inalação aguda de residual oil fly ash em ratos submetidos ao treinamento físico**. 2011. 99 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre.
- PINHO, R. A. *et al.* Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biology International**, v. 30, n. 10, p. 848-853, 2006.
- POPE, C. A.; DOCKERY, D. W. Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 56, n. 6, p. 709-742, 2006.
- POPE, C. A.; EZZATI, M.; DOCKERY, D. W. Fine-Particulate Air Pollution and Life Expectancy in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 4, p. 376-386, 2009.

- POPE, C. A. *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **The Journal of the Medical American Association**, v. 287, n. 9, p. 1132-1141, 2002.
- RAMAGE, L.; GUY, K. Expression of C-reactive protein and heat-shock protein-70 in the lung epithelial cell line A549 in response to PM10 exposure. **Inhalation Toxicology** v. 16, n. 6-7, p. 447-452, 2004.
- RENKE, J. *et al.* 2000. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 2, p. 101-104, 2000.
- RETH, M. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed, New York: Oxford University Press, p. 79-186, 2007.
- RHODEN, C. R.; GHELFI, E.; GONZÁLEZ-FLECHA, B. Pulmonary inflammation by ambient air particles is mediated by superoxide anion. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 11-15, 2008.
- RHODEN, C. R. *et al.* N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. **Toxicological Sciences**, v. 79, n. 2, p. 296-303, 2004.
- RHODEN, C. R. *et al.* PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, n. 3, p. 305-313, 2005.
- RICHTER-LANDSBERG, C. Heat shock proteins: Expression and functional roles in nerve cells and glia. In: **Heat shock proteins in neural cells**. Austin: Landes Bioscience, p. 1-12, 2007.
- RITOSSA, F. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.
- ROBERTS, E. S. *et al.* Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology. **Inhalation Toxicology**, v. 15, n. 13, p. 1327-1346, 2003.
- RUCKERL, R. *et al.* Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. **Inhalation Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 555-592, 2011.
- RUELL, P. A. Plasma Hsp72 is higher in runners with more serious symptoms of exertional heat illness. **European Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 732-736, 2006.

- SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 55-63, 2000.
- SANTOS, M. C. *et al.* Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. **Biomarkers**, v. 9, n. 6, p. 461-469, 2004.
- SCHROEDER, W. H. *et al.* Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: A review. **JAPCA**, v. 37, n. 11, p. 1267-1285, 1987.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32, 1936.
- SELYE, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. **Canadian Medical Association Journal**, v. 115, n. 1, p. 53-56, 1976.
- SIMON, A. R. *et al.* Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 6 Pt 1, p. C1640-C1652, 1998.
- SMOLKA, M. B. *et al.* HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5, p. R1539-R1545, 2000.
- SON, W. Y. *et al.* Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 12, p. 1122-1126, 1999.
- SORENSEN, M. *et al.* Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. **Mutation Research**, v. 544, n. 2-3, p. 255-271, 2003.
- STEPHENS, J. W.; KHANOLKAR, M. P.; BAIN, S. C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 2, p. 321-329, 2009.
- STONE, R. Counting the cost of London's killer smog. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2106-2107, 2002.
- STRAK, M. *et al.* respiratory health effects of airborne particulate matter: the role of particle size, composition, and oxidative potential – The RAPTES Project. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1183-1189, 2012.
- SUN, Q. *et al.* Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. **The Journal of the Medical Association**, v. 294, n. 23, p. 3003-3010, 2005.

TERRY, D. F. *et al.* Cardiovascular disease delay in centenarian offspring: Role of heat shock proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 502-505, 2004.

TERRY, D. F. *et al.* Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 11, p. 862-868, 2006.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs. **Journal of Molecular Biology**, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN EDEN, W.; YOUNG, D. B. **Stress proteins in medicine**. New York: Marcel Dekker, 578 p., 1996.

YANG, X. *et al.* Using lymphocyte and plasma Hsp70 as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers. **Environmental Health Perspectives** v. 115, n. 11, p. 1573-1577, 2007.

YEH, C. H. *et al.* Circulating heat shock protein 70 and progression in patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 33, n. 2, p. 212-217, 2009.

YOSHIDA, Y. *et al.* Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 3, p. 747-753, 2003.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal Clinical of Pathology**, v. 54, p 176-186, 2001.

WALLENBORN, J. G. *et al.* Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 1, p. 231-239, 2007.

WANG, H. *et al.* Expression of Hsp27 and Hsp70 in lymphocytes and plasma in healthy workers and coal miners with lung cancer. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences**, v. 30, n. 4, p. 415-420, 2010.

WINTERBOURN, C. C. 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 969-974, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **7 million premature deaths annually linked to air pollution**. Geneva, 2014. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Air quality guidelines global update 2005: Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide**. Copenhagen, 484 p., 2006, ISBN 92-890-2192-6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health effects of particulate matter: Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia**. Copenhagen, 15 p., 2013, ISBN 978-92-890-0001-7.

WU, C. HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTORS: Structure and Regulation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 441-469, 1995.

ZANCHI, A. C. *et al.* Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 9, p. 795-800, 2008.

ZANCHI, A. C. T. *et al.* Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: The role of oxidative stress. **Inhalation Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 910-918, 2010.

ZHANG, X. *et al.* Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome. **Cell Stress & Chaperones**, v. 15, n. 5, p. 675-686, 2010.

4 ARTIGO

(Periódico *Inhalation Toxicology*, Fator de Impacto 2,34)

Instillation of *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) triggers plasma oxidative stress and increased HSP70 without modifications of the redox state and stress response in lymphoid tissues

Fernanda Giesel Baldissera^{1,2}, Analú Bender dos Santos¹, Maicon Machado Sulzbacher¹, Pauline Brendler Goettems-Fiorin^{1,2}, Bethânia Salamoni^{1,2}, Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner¹, Claudia Ramos Rhoden², and Thiago Gomes Heck^{1,2,3}

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

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

³Postgraduation Program in Integral Attention to Health (PPGAIS – UNIJUÍ/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brazil

Corresponding Author

Fernanda Giesel Baldissera

Research Group in Physiology, Department of Life Sciences, Regional University of Northwestern State's Rio Grande do Sul

Rua do Comércio, 3000, Bairro Universitário

98700-000 – Ijuí, RS – Brazil

Phone: (55) 3332 0476

E-mail: baldissera.fernanda@yahoo.com

Running title: ROFA induces eHSP70 and oxidative stress in the plasma

Acknowledgements

The authors would like to thank R.D.B., Basso (UNIJUÍ), E.G. de P., Basso (UNIJUÍ), P.H.N., Saldiva (USP), and colleagues from 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 Rio Grande do Sul State Foundation for Research Support (PqG-2013 – FAPERGS, process: 002106-2551/13-5, T.G., HECK). F.G., Baldissera and P.B.G., Fiorin were supported by a fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and A.B., dos Santos was supported by fellowship from FAPERGS.

Competing financial interests

The authors declare they do not have competing financial interests.

ABSTRACT

The exposure to particulate matter, including to fine particulate matter (PM_{2.5}), has been associated with the development of adverse health conditions, promoting oxidative stress and changes in the heat shock proteins of 70 kDa (HSP70) content in many tissues. *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) are inorganic residues present in the fuel oil and contribute to the urban PM_{2.5} toxicity by inducing oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate if ROFA instillation for three consecutive days in rats induces alterations in the HSP70 levels in the plasma and in the lymphoid tissues and if are associated with alterations in the redox state (carbonyl groups, lipid peroxidation, SOD and CAT activities and sulfhydryl groups). Acute exposure to ROFA showed higher eHSP70 (plasma) content (19 %), especially eHSP72 (29 %), and plasma oxidative stress (increased 9 % in protein carbonyl groups, 14 % in SOD activity, 29 % in SOD/CAT activities, and decreased 14 % in sulfhydryl groups), without modifying circulating leukocytes levels. ROFA instillation did not change the HSP70 content and redox state in lymphoid tissues and support hypothesis this pollutant acutely is not able to elicit damage in these tissues. Our results suggest the high content of eHSP70 is a warning sign and mark subclinical risk condition triggered by oxidative stress after acute instillation of ROFA.

Keywords: *Residual Oil Fly Ash*; HSP70; oxidative stress; lymphoid tissues.

INTRODUCTION

Air pollutants exposure, for short and long-term, are strongly associated with the development of respiratory, cardiovascular and cancer diseases, and its deleterious effects are attributed to particulate matter (PM) (WHO, 2014). Smaller particles, like fine particulate matter (PM_{2.5}), are the most harmful to the organism (Harrison; Yin, 2000) and its atmospheric concentration is considered from WHO (2006) the best indicator of health risk from exposure to air pollution. The particles of PM_{2.5} originate primarily from the combustion of fossil compounds, used for energy generation and transport, contributing to the progressive changes in atmospheric composition (Ghio et al., 2012).

Inorganic residues remaining after the incomplete oxidation of carbon-containing compounds present in the fuel oil are called *Residual Oil Fly Ash* (ROFA), rich in metals and significantly contributing to the development of urban PM. The aerodynamic particle size of the ROFA correspond mainly to PM_{2.5}, usually a validated substitute of the atmospheric PM *per se* in the experimental studies (Ghio et al., 2002).

The exposure to ROFA is capable to promote oxidative stress and contribute to the development and progression of diseases, including immune response alterations, considered as a condition of cellular stress (Delfosse et al., 2013; Marchini et al., 2014). The cellular stress response is essential for survival and promotes increase of the expression of heat shock proteins (HSP), especially HSP70 (Guisbert; Morimoto, 2013). HSP70 content inside the cell have cytoprotective function, however, under stress condition these proteins may be released from cells, as lymphocytes, acting as a modulator of immune responses (Mambula et al., 2007; Hunter-Lavin et al., 2004).

Therefore, the objective of this study was to evaluate if acute instillation of ROFA causes alterations in the HSP70 content in the plasma and in the lymphoid tissues: mesenteric lymph nodes, thymus and spleen, and if they occur in parallel with changes in the redox state.

MATERIALS AND METHODS

Animals

It was used 24 male Wistar rats, 90 days old and weighing ~300 g, maintained under controlled temperature (23 °C), humidity and 12 h light/dark cycle. Water and standard rodent laboratory diet were supplied *ad libitum*. The investigation followed the ethical rules established by the *Guide for Care and Use of Experimental Animals* published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996). All procedures involving animals were approved by the Local Committee of Animal Welfare of the University (protocol no. 005/2014).

Experimental Design

The animals were randomly distributed into two groups (n = 12 per group): control rats and polluted (ROFA) rats. Control and ROFA animals underwent intranasal instillation of 100 µL of saline (0.9 %) or 100 µL of ROFA suspension (750 µg/100 µl; 2.5 mg/kg), respectively, for three consecutive days. 24 h after the last exposure the animals were euthanized by decapitation. Blood, mesenteric lymph nodes, thymus and spleen were collected.

Characterization of Particles

The ROFA consisted of particles retained in the electrostatic precipitator installed in one of the chimneys of a large steel plant localized in São Paulo city, Brazil. The elemental composition of ROFA suspension particles was determined by neutron activation analysis that involved short irradiations of 5 min for the determination of chlorine (Cl), potassium (K), manganese (Mn), sodium (Na), and strontium (Sr) using a pneumatic transfer system facility under a thermal neutron of 1.4×10^{12} neutrons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Longer irradiations of 16 h under a thermal neutron flux of about 10^{12} neutrons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ were performed for determinations of As, Ba, Ca, Ce, Cr, Co, K, La, Mn, Na, Rb, Sb, Sc, Th, V, and Zn. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyper-pure detector model GX2020 coupled to a model 1510 (Perkin Elmer Ortec, Oak Ridge, TN, USA) integrated signal processor, both from Canberra Corporate Headquarters (Meriden CT, USA). Counting times from 200 to 50,000 s were used, depending on the half-lives or activities of radioisotopes considered. The radioisotopes measured were identified according to their half-lives and γ -ray energies. The concentrations of the elements were calculated using a comparative method. Measurements of the diameters of the particles (largest diameter) were made using an integrating eyepiece with polarized light microscopy. Each line in the eyepiece represented a 10 μm length at a magnification of 1000 x.

The trace elements of the ROFA are described in the Table 1. Almost all particles had a diameter less than 10 μm , the means and standard deviations were 1.7 ± 2.56 μm for carbon particles and 1.2 ± 2.24 μm for transition metals particles. About 78 % of carbon particles and 98 % of transition metals particles had a diameter less than 2.5 μm .

Total and Differential Leukocytes Counts

Total leukocytes count in the blood was proceeded in Neubauer's chamber, using liquid Turck at 1:20 dilution to erythrocyte hemolysis. Leukocytes found in the four side quadrants of the chamber were counted and multiplied by 50. Results are expressed as leukocytes per μL of the blood (Hoffbrand et al., 2008). Differential leukocyte count was determined by blood smear and quick panotic staining. It was counted 100 leukocytes. Lymphocytes, neutrophils, monocytes and band neutrophils were differentiated. Results are expressed as percentage of cells per mL of the blood.

Tissue Preparation

The blood was collected with EDTA and centrifuged at $1800 \times g$ for 10 min to separate the plasma and subsequently add protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma), consisting of leupeptin ($4,2 \mu\text{M}$), aprotinin ($0,31 \mu\text{M}$), TLCK (N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, hydrochloride; $20 \mu\text{M}$), PMSF (phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, $100 \mu\text{M}$), sodium orthovanadate (Na_3VO_4 ; 1 mM), sodium molybdate (Na_2MoO_4 ; 1 mM) and β -glycerophosphate. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored in freezer at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Lymphoid tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and kept in a freezer at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. The samples were divided in three aliquots. Each part was homogenized in different solution with protease and phosphatase inhibitors described above for further analyzes: a) sodium dodecyl sulfate (SDS) solution 0.1% for Western blot, b) potassium phosphate (KPi) solution, pH 7.4 for protein carbonyls, lipid peroxidation, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities and c) EDTA solution 0.02 mol/L for tissue

sulfhydryl groups. Homogenates were centrifuged at 1800 x *g* for 10 min at room temperature and supernatant fractions were frozen and stored in freezer at -20 °C.

Protein Determination

Protein determination was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as standard. Measurements were carried out at 595 nm and the results are expressed in mg of protein per mL of sample.

HSP70 Content

In order to examine HSP70 content in the plasma, mesenteric lymph nodes, thymus and spleen, the samples were processed for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein concentration was determined by Bradford assay (1976). Equivalent amounts of protein from each tissue sample (~40 µg) and equivalent volume from each plasma sample (10 µL) were mixed with Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris (10% w/v), SDS (10% v/v), glycerol (10% v/v), 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min and electrophoresed in a 10% polyacrylamide minigel for 4 h at 15 mA/gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE HealthCare) according to the electrotransfer (Bio-Rad) manufacturer's instructions (1 h, 100 V) and transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma) in 3% (w/v) trichloroacetic acid solution. For immunoblotting procedures SNAP i.d. (Merck Millipore) quick immunoblot vacuum system was used, optimizing the antibodies reaction time. Membranes were washed with wash buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v)] and blocked in 0.5% (w/v) non-fat dry milk in wash buffer. Membranes were washed and incubated for 20 min with mouse anti-HSP70 monoclonal antibody (Sigma H5147) which recognizes both the 73-

kDa constitutive HSC70 (HSPA8 gene) and the 72-kDa inducible HSP70 (HSPA1A gene) forms, at 1:500 dilution. Membranes were washed and incubated for 20 min with horseradish peroxidase (HRP), labelled anti-mouse IgG (whole molecule) secondary antibody (Sigma A9044), at 1:15000 dilution. The membranes were washed. Detection of HSP70 was performed by enhanced chemiluminescence method (ECL Plus RPN2132, GE). Protein bands were revealed in film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Health Care), photodocumented and quantified in ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/>). Tissues actin analysis were performed by Coomassie Blue-stained gel [Coomassie Blue R 250 (0.1% w/v), glacial acetic acid (10% v/v) and methanol (40% (v/v))], photodocumented and quantified in ImageJ software for normalization.

Protein Carbonyls

The protein oxidative damage was evaluated by protein carbonyl groups measurement based on the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Yan et al., 1995). The samples were incubated with DNPH for 1 h, after that the proteins were precipitated with a 3% SDS denaturing solution and added to ethanol and hexane followed by vigorous shaking and centrifugation. Blanks were made for all samples, prepared according to the above description, except DNPH. The absorbance was measured at 370 nm and protein carbonyl groups determined by the molar extinction coefficient equals to $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Protein concentration for each sample was determined by Bradford (1976) assay. Results are expressed as μmol of protein carbonyl groups per mg protein.

Lipid Peroxidation

Determination of lipid peroxidation was performed using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay by Buege; Aust (1978). For measurements of TBARS protein homogenates were precipitated with 10% trichloroacetic acid, centrifuged and incubated with thiobarbituric acid (Sigma, Chem. Co.) for 15 min at 100 °C. TBARS were extracted using butanol (1:1). After centrifugation, the absorbance of the butanol layer was measured at 535 nm. The concentration of TBARS formed was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per mg of protein.

Sulphydryl

The free sulphydryl groups in plasma were measured from the reaction of groups of 5'5'dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and consequent release of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) (Himmelfarb et al., 2000). 50 µL of plasma were added to 1 mL of 0.1 mol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, pH 8.2, followed by addition of 50 µL of 10 mmol/L DTNB in methanol. Blanks were made for all samples, prepared according to the above description, except DTNB. The preparations were incubated for 15 minutes and the absorbance was measured at 412 nm. The concentration of sulphydryl groups were determined by the molar extinction coefficient of the TNB, corresponding to 14,100 M⁻¹ cm⁻¹. Results are expressed as µmol/L.

Total sulphydryl groups in tissues were measured using the assay described by Sedlak; Lindsay (1968). 100 µL of tissue homogenate were added to 300 µL of 0.02 mol/L Tris, pH 8.2, 20 µL of 0.01 mol/L DTNB in methanol and 1.58 mL of methanol. Blanks (without sample) and a sample blank (without DTNB) were prepared in a similar manner. The solutions were incubated for 15 min and centrifuged at 1800 x g for 15 min.

The absorbance of the supernatant was measured at 412 nm. Total sulfhydryl groups were calculated by the molar extinction coefficient equal to $13,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Results are expressed as $\mu\text{mol/L}$.

Catalase and Superoxide Dismutase Activities

In order to determine CAT activity, the decomposition of hydrogen peroxide (10 mmol/L) was determined at 240 nm for 120 seconds (Aebi, 1984). Results are expressed as pmol of CAT per mg protein. SOD activity was measured from the inhibition of pyrogallol autooxidation at 420 nm in 60 and 120 seconds. One unit of SOD is defined as the quantity of enzyme that is capable of inhibiting 50% of the reaction (Marklund; Marklund, 1974). Results are expressed as units of SOD per mg of protein.

Statistical Analysis

Data are described in mean and standard deviation. Kolmogorov-Smirnov normality test was applied previously to all analysis. Student *t*-test and Mann-Whitney test were used to compare parametric and nonparametric variables, respectively. The level of significance was set at 5 %.

RESULTS

Intranasal instillation of ROFA suspension for three consecutive days resulted in higher levels (19 %) of plasma content of eHSP70 ($P = 0.04$; Figure 1A) compared to control rats. This effect was a result of higher (29 %) HSP72 inducible form ($P = 0.02$; Figure 1B), but not HSP73 constitutive form ($P = 0.10$; Figure 1C), both compared to control. The lymphoid tissues mesenteric lymph nodes ($P = 0.68$), thymus ($P = 0.42$) and spleen ($P = 0.58$) showed no alteration in HSP70 content, as observed in the Table 2.

The ROFA instillation triggered plasma oxidative stress in the animals, evidenced by higher protein carbonyl groups ($P = 0.04$; Figure 2A) and lower total sulfhydryl groups ($P = 0.002$; Figure 2B) in the plasma. The results also showed higher SOD activity ($P = 0.03$; Figure 2C), while CAT activity remained at the same levels of the control animals ($P = 0.39$; Figure 2D). Thus, we observed higher ratio of these enzymes in the plasma ($P = 0.04$; Figure 2E). We found no alterations in the lipid peroxidation levels ($P = 0.82$; Figure 2F).

Instillation of ROFA did not modify total (Figure 3A) and specific leukocytes counts (Figure 3B – E). Mesenteric lymph nodes, thymus and spleen showed no alterations in the oxidative stress variables evaluated in this study (Table 2).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The animals exposed to ROFA showed higher plasma content of eHSP70 than the control animals, especially eHSP72. The HSP72 is the major member of the HSP70 family identified in the extracellular environment under stressful conditions (Johnson; Fleshner, 2006). Previous study have reported that chronic *in vivo* exposure to PM has showed higher level of eHSP70 in plasma (Kido et al., 2011). Therefore, this is the first study that shows higher eHSP70 in plasma, especially eHSP72, in response to acute exposure to air pollutants.

Increased eHSP70 have shown a strong relation with oxidant state of the organism (Ramage; Guy, 2004; Gelain et al., 2011). Thus, we investigated in the plasma the main harmful mechanism of action of exposure to environmental pollutants: the oxidative stress (Lodovici; Bigagli, 2011). Animals exposed to ROFA, when compared to control animals, showed higher protein carbonyl groups, lower total sulfhydryl groups

and did not alter lipid peroxidation in plasma. These results demonstrate protein oxidative damage and decrease in plasma antioxidant capacity.

Moreover, the exposure to this pollutant also promoted increase in SOD activity without changing the levels of CAT activity, both in plasma. Despite the higher activity of any of them, the tight relation between their activities (SOD product is in fact the substrate of the CAT reaction) makes it necessary to balance their catalysis actions to result an effective antioxidant defense. 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 (Amstad et al., 1991; Pinho et al., 2006). When evaluating the relationship between the enzymes activities, we found higher ratio in animals exposed to ROFA. This result demonstrates enzymatic imbalance, which may cause accumulation of hydrogen peroxide in the organism. Considering the high concentration of iron in ROFA particles, this ROS can have originated hydroxyl radicals by Fenton reactions and might have contributed to protein oxidative damage in plasma.

Increasing eHSP70 content and oxidative stress in plasma were found in other stress conditions, such as disease. Extracellular oxidative stress is able to modulate the increase in eHSP70 content, demonstrating to aggravate or to be responsible for deleterious effects on the organism (Gelain et al., 2011). The prooxidant environment being able to oxidize and trigger structural changes in the HSP70 molecule, resulting in functional impairment, especially in the danger signal (Grunwald et al., 2014).

The eHSP70 can act as a danger signal to immune cells and, therefore, modulate the immune system (Campisi et al., 2003). Previous clinical and experimental evidences

demonstrates that low levels of eHSP70 has been suggested as an indicator of health (Terry et al., 2006) and high levels have been associated to diseases (Pockley et al., 2014) and injury under stress conditions, including chronic exposure to air pollutants (Yang et al., 2007; Wang et al., 2010). The increase of plasma eHSP70 after acute instillation of ROFA corroborates with these findings, contributing to the evidence of potential biomarker of eHSP70 to the adverse conditions of the organism, including acutely.

Plasma alterations found in this study do not occur in parallel with levels changes of circulating leukocytes, which are clinical parameter and frequently investigated for the prevention and monitoring of adverse human health conditions (Dhabar; McEwen, 1997). Gordon and colleagues (1998) has showed that, immediately after 3 h of exposure to concentrated ambient PM, the percentage of neutrophils and lymphocytes in peripheral blood was elevated and decreased, respectively, returning to baseline levels 24 h after exposure. In our study, after 24 h to the last instillation of ROFA did not modify total and specific leukocytes levels, however the exposed animals showed important plasma alterations, demonstrating that clinical parameters can not always identify adverse conditions to the organism.

Studies have shown that exposure to the MP_{2.5} is able of suppressing immune functions important (Zelikoff *et al.*, 2003). In this context, lymphocytes has demonstrated continuously release HSP70 into the circulation and increase the release under stress conditions (Hunter-Lavin et al., 2004). Thus, the HSP70 content in lymphocytes is associated with stress conditions from aging (Jin et al., 2004a), disease stages (Jin et al., 2004b) and protection against genotoxic damage (Xiao et al., 2002), demonstrate

strong relationship between HSP70 intracellular content in the lymphocytes and signaling of the condition cellular stress and the organism as a whole.

Based on these considerations, we measure the HSP70 content and redox state variables in lymphoid tissues: mesenteric lymph nodes, thymus and spleen. However, ROFA instillation did not alter HSP70 expression and redox state variables in these tissues, suggesting that acute exposure to this pollutant is not able to trigger effect in these organs.

In summary, our results demonstrated that ROFA exposure increased eHSP70, especially eHSP72, triggered protein oxidative stress in the plasma and maintained baseline levels of circulating leukocytes. These findings indicates the existence of subclinical adverse condition. Thus, we suggest that the high content of eHSP70 is a warning sign and mark subclinical risk condition triggered by oxidative stress after acute instillation of ROFA.

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.
- Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault M, Moret R, Zbinden I, Cerutti P. 1991. The balance between CuZn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30:9305–9313
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–309.
- 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.
- Campisi J, Leen TH, Fleshner M. 2003. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones* 8:272–286.
- Delfosse VC, Tasat DR, Gioffré AK. 2013. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. *Environ Toxicol* DOI: 101002/tox21936.

- Dhabhar FS, McEwen BS. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11:286–306.
- Gelain DP, Pasquali MAB, Comim CM, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. 2011. Serum heat shock protein 70 levels oxidant status and mortality in sepsis. *Schock* 35:466–470.
- Ghio AJ, Carraway MS, Madden MC. 2012. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells tissues and living systems. *J Toxicol Environ Health Part B* 15:1–21
- Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. 2002. Biologic effects of oil fly ash. *Env Heal Persp* 110:89–94.
- Gordon T, Nadziejko C, Schlesinger R, Chen LC. 1998. Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. *Toxicol Lett* 96–97:285–288.
- Grunwald MS, Pires AS, Zanotto-Filho A, Gasparotto J, Gelain DP, Demartini DR, Schöler CM, Bittencourt PIH, Moreira JCF. 2014. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. *Cell Stress Chaperones* DOI: 10.1007/s12192-014-0516-5.
- Guisbert E, Morimoto RI. 2013. The regulation and function of the heat shock response. In: Morimoto RI, Christen Y. (Ed.). *Protein quality control in neurodegenerative diseases, research and perspectives in Alzheimer's disease*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg p. 1-18 DOI 10.1007/978-3-642-27928-7_1.
- Harrison RM, Yin J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: Which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ* 249:85–101.
- Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. 2000. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 58:2571–2578.
- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. 2008. *Fundamentos em Hematologia* 5ed Artmed.
- Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MMFVG, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JHH. 2004. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324:511–517.
- Jin X, Wang R, Xiao C, Cheng L, Wang F, Yang L, Feng T, Chen M, Chen S, Fu X, Deng J, Wang R, Tang F, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. 2004a. Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: A study in the normal chinese population. *Cell Stress Chaperones* 9:69–75.
- Jin X, Xiao C, Tanguay RM, Yang L, Wang F, Chen M, Fu X, Wang R, Deng J, Deng Z, Zheng Y, Wei Q, Wu T. 2004b. Correlation of lymphocyte heat shock protein 70 levels with neurologic deficits in elderly patients with cerebral infarction. *Am J Med* 117:406–411.
- Johnson JD, Fleshner M. 2006. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*. 79:425–434.
- 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* 23:593–601.
- Lodovici M, Bigagli E. 2011. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol* 2011:1–9.

- Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK. 2007. Mechanisms for Hsp70 secretion: Crossing membranes without a leader. *Methods* 43:168–175.
- Marchini T, Magnani ND, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, González Maglio DH, Alvarez S, Evelson PA. 2014. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to residual oil fly ash. *Toxicol Appl Pharmacol* 274:274–282.
- Marklund S, Marklung G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474.
- 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.
- Pockley AG, Henderson B, Multhoff G. 2014. Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans* 42:1744–1751.
- 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* 16:447–452.
- 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.
- Terry DF, Wyszynski DF, Nolan VG, Atzmonc G, Schoenhofen EA, Pennington JY, Andersen SL, Wilcox MA, Farrer LA, Barzilai N, Baldwin CT, Asea A. 2006. Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. *Mech Ageing Dev* 127:862–868.
- Xiao C, Chen S, Li J, Hai T, Lu Q, Sun E, Wang R, Tanguay RM, Wu T. 2002. Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. *Cell Stress Chaperones* 7:396–402.
- Yan L, 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.
- Yang X, Zheng J, Bai Y, Tian F, Yuan J, Sun J, Liang H, Guo L, Tan H, Chen W, Tanguay RM, Wu T. 2007. Using lymphocyte and plasma Hsp70 as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers. *Environ Health Perspect* 115:1573–1577.
- Wang H, Xing J, Wang F, Han W, Ren H, Wu T, Chen W. 2010. Expression of Hsp27 and Hsp70 in lymphocytes and plasma in healthy workers and coal miners with lung cancer. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 30:415–420.
- World Health Organization. 2006. *Air quality guidelines global update 2005: Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide*. Copenhagen, 484 p., ISBN 92-890-2192-6.
- World Health Organization. 2014. *7 million premature deaths annually linked to air pollution*. Geneva. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/>.
- Zelikoff JT, Chen LC, Cohen MD, Fang K, Gordon T, Li Y, Nadziejko C, Schlesinger RB. 2003. Effects of inhaled ambient particulate matter on pulmonary antimicrobial immune defense. *Inhal Toxicol* 15:131–150.

FIGURES

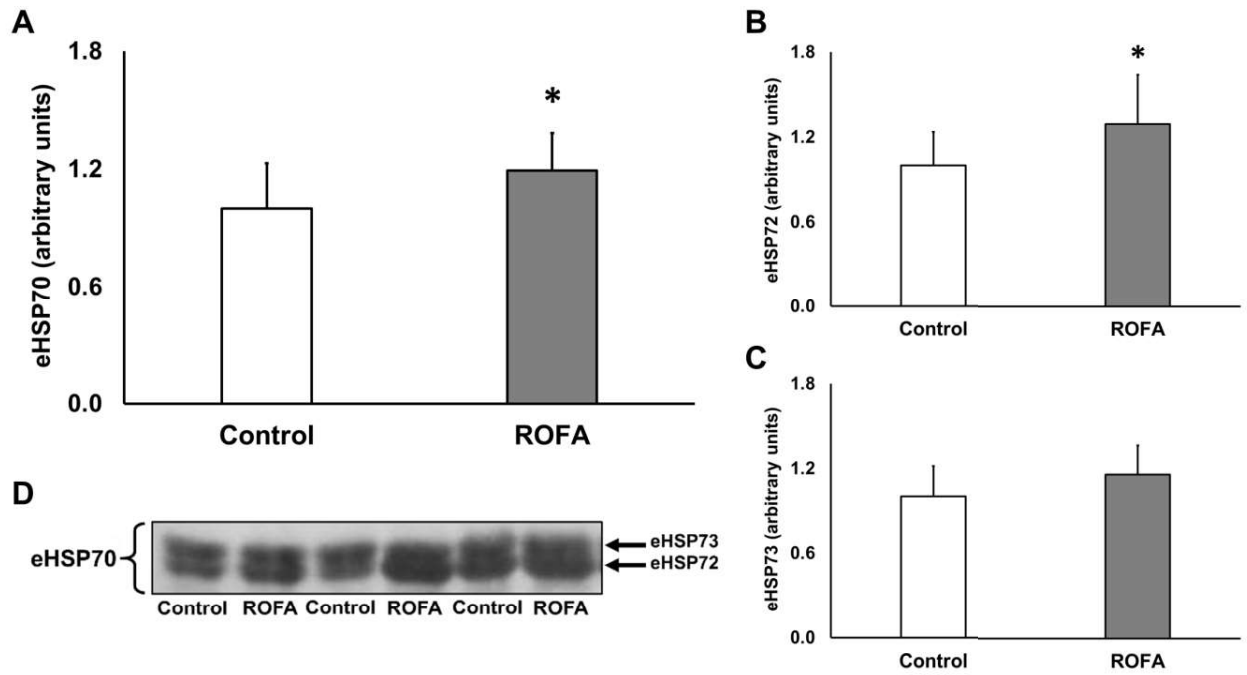


Figure 1. HSP70 content in plasma. The values are presented as mean \pm SD, n = 10 to 12 rats per group, * P < 0.05. (A) HSP70 content in plasma, (B) HSP72 content in plasma, (C) HSP73 content in plasma and (D) representative immunoblots of HSP70

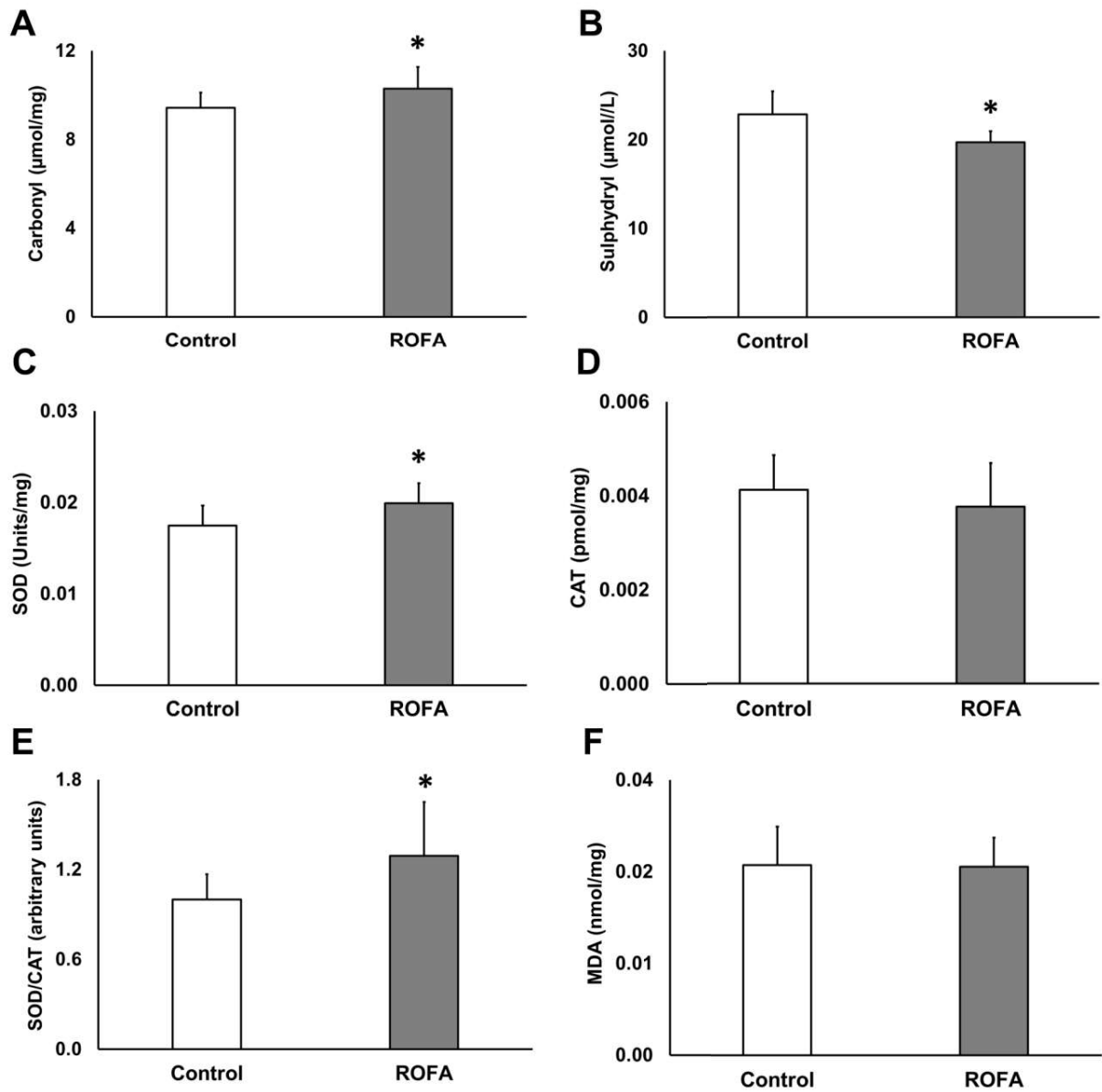


Figure 2. Plasma oxidative stress. The values are presented as mean \pm SD, n = 8 to 10 rats per group, * P < 0.05. (A) Protein carbonyl groups, (B) sulphydryl groups, (C) SOD activity, (D) CAT activity, (E) SOD/CAT activities and (F) lipid peroxidation

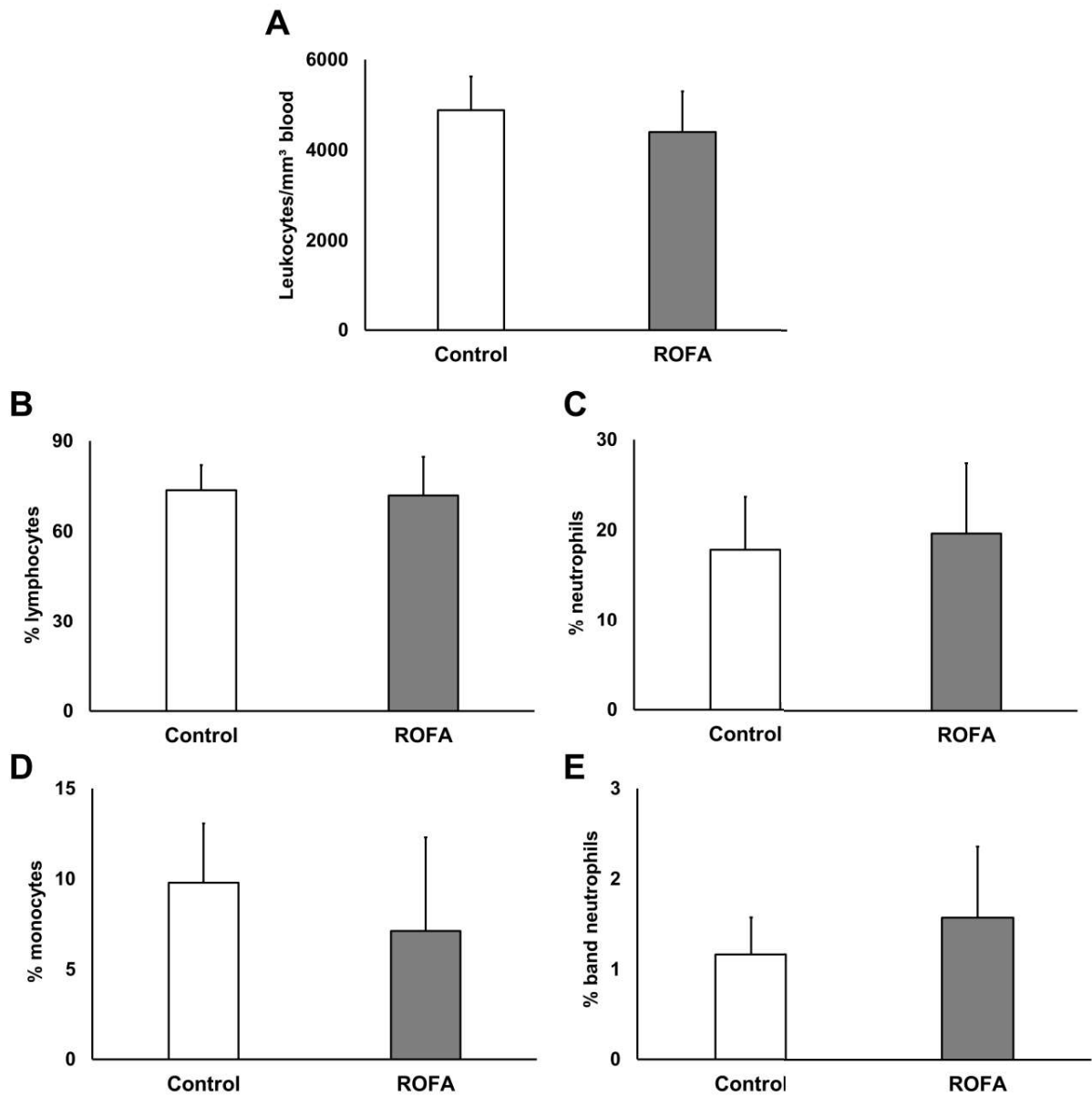


Figure 3. Total and differential leukocytes counts. The values are presented as mean \pm SD, n = 9 to 12 rats per group. (A) Total leukocytes per μ L of blood, (B) percentage of lymphocytes in the blood, (C) percentage of neutrophils in the blood, (D) percentage of monocytes in the blood and (E) percentage of band neutrophils in the blood

TABLES**Table 1. Trace elements concentration of the ROFA particles**

<i>Trace elements</i>	<i>Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>
<i>Fe</i>	1058.9 ± 2.37
<i>Rb</i>	719.7 ± 1.0
<i>Zn</i>	491.9 ± 3.1
<i>As</i>	154.4 ± 0.8
<i>Cr</i>	107.7 ± 1.4
<i>V</i>	35 ± 4
<i>Ce</i>	16.3 ± 0.3
<i>La</i>	10.3 ± 0.1
<i>Co</i>	9.9 ± 0.25
<i>Mn</i>	3.8 ± 24
<i>Sb</i>	2.2 ± 0.9
<i>Br</i>	1.5 ± 19

Table 2. HSP70 content and oxidative stress of lymphoid tissues. The values are presented as mean \pm SD. Mesenteric lymph nodes (n = 7 to 10 rats per group), thymus (n = 7 to 10 rats per group), spleen (n = 8 to 11 rats per group)

<i>Tissue</i>	<i>Variables</i>	<i>Control</i>	<i>ROFA</i>	<i>P value</i>
<i>Mesenteric lymph nodes</i>	<i>HSP70 (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.19	1.04 \pm 0.23	0.699
	<i>Carbonyl (μmol/mg)</i>	377.63 \pm 68.44	374.16 \pm 96.84	0.929
	<i>Sulphydryl (μmol//L)</i>	125.67 \pm 9.27	126.43 \pm 16.80	0.922
	<i>SOD (Units/mg)</i>	0.25 \pm 0.05	0.29 \pm 0.09	0.263
	<i>CAT (pmol/mg)</i>	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.876
	<i>SOD/CAT (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.21	1.09 \pm 0.36	0.537
	<i>MDA (nmol/mg)</i>	1.76 \pm 0.31	1.98 \pm 0.65	0.773
<i>Thymus</i>	<i>HSP70 (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.31	0.89 \pm 0.17	0.411
	<i>Carbonyl (μmol/mg)</i>	282.13 \pm 42.30	253.16 \pm 29.83	0.106
	<i>Sulphydryl (μmol//L)</i>	107.78 \pm 10.23	110.20 \pm 6.64	0.602
	<i>SOD (Units/mg)</i>	0.18 \pm 0.05	0.18 \pm 0.04	0.921
	<i>CAT (pmol/mg)</i>	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.283
	<i>SOD/CAT (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.48	0.85 \pm 0.24	0.410
	<i>MDA (nmol/mg)</i>	1.77 \pm 0.39	1.87 \pm 0.56	0.640
<i>Spleen</i>	<i>HSP70 (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.21	1.06 \pm 0.24	0.570
	<i>Carbonyl (μmol/mg)</i>	159.20 \pm 32.15	152.92 \pm 28.63	0.660
	<i>Sulphydryl (μmol//L)</i>	351.76 \pm 67.15	385.50 \pm 85.44	0.361
	<i>SOD (Units/mg)</i>	0.09 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.193
	<i>CAT (pmol/mg)</i>	0.012 \pm 0.003	0.012 \pm 0.001	0.653
	<i>SOD/CAT (arbitrary units)</i>	1.00 \pm 0.23	1.13 \pm 0.26	0.281
	<i>MDA (nmol/mg)</i>	0.93 \pm 0.31	0.92 \pm 0.29	0.912

5 CONCLUSÃO

Após a instilação de ROFA por três dias consecutivos em ratos, foi possível observar nestes animais:

Aumento do conteúdo de eHSP70, especialmente eHSP72, no plasma;

Estresse oxidativo plasmático, demonstrado pelo dano oxidativo proteico e ação ineficaz de defesas antioxidantes;

Níveis inalterados de leucócitos circulantes totais e diferenciais;

Não houve alterações na expressão de HSP70 e no estado redox em linfonodos mesentéricos, timo e baço, sugerindo que a exposição aguda ao ROFA não causa dano nestes tecidos.

Desta forma, o aumento do conteúdo de eHSP70, o estresse oxidativo plasmático e a manutenção dos níveis basais de leucócitos circulantes sugerem a existência de condição adversa subclínica. Portanto, sugerimos que o conteúdo elevado de eHSP70 é um sinal de alerta e marca condição de risco subclínico desencadeado por estresse oxidativo após instilação aguda de ROFA. Este é o primeiro trabalho que demonstra aumento desta proteína *in vivo* após exposição aguda a poluentes atmosféricos.

ANEXOS**ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais**

Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI
CEUA/UNIJUI

PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 005/2014

Protocolo de Pesquisa nº. 017/2013 de 03/12/2013.

Projeto: “Razão eHSP70/iHSP70 como Biomarcador de estresse Oxidativo Causado pela Poluição Atmosférica.”

Finalidade: Pesquisa.

Pesquisador Responsável: Prof. Thiago Gomes Heck

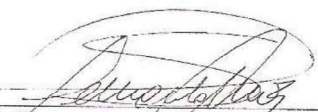
Colaboradores: Claudia Ramos Rhoden, Mirna Stela Ludwig, Fernanda Giesel Baldissera, Analú Bender dos Santos, Eloisa Gabriela de Pellegrin Basso, Maicon Machado Sulzbacher, Renan Daniel Bueno Basso, Yohanna Hannah Donato,

Avaliação do Protocolo de Pesquisa, segundo orientações da Lei Nº 11.794 de outubro de 2008.

PARECER DA COMISSÃO

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**. 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 Nº01 do CONCEA, de 09 de julho de 2010.

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.



Prof. Fernando Silvério Ferreira da Cruz
Coordenador da CEUA/UNIJUI

ANEXO B – Normas para submissão de artigo: *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
Redundant publications and plagiarism
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").

We also request that all authors complete an International Committee of Medical Journals Editors' conflict of interest form in advance of submission; the submitting author must upload each author's form as supplemental files along with the manuscript.

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* 47:218–223.
- *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 biochemical engineering approach. In: Robinson JR, ed. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 557–593.
- *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 Healthcare 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 Acknowledgements 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 InformationProofs

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.