



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA

“A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A 1,2-NQ INDUZ INFLAMAÇÃO NO TECIDO
ADIPOSO E ALTERA A HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE CAMUNDONGOS VIA
TNFR1 E TLR4”

“SUBCHRONIC EXPOSURE TO 1,2-NQ INDUCES ADIPOSE TISSUE
INFLAMMATION AND CHANGES THE ENERGY HOMEOSTASIS OF MICE VIA
TNFR1 AND TLR4”

LIMEIRA

2019

CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA

“A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A 1,2-NQ INDUZ INFLAMAÇÃO NO TECIDO
ADIPOSO E ALTERA A HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE CAMUNDONGOS VIA
TNFR1 E TLR4”

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E DO ESPORTE E METABOLISMO, na Área de BIODINÂMICA DO MOVIMENTO HUMANO E ESPORTE.

Thesis presented to the School of Applied Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in the area of NUTRITION, SPORTS AND METABOLISM SCIENCE.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Patrícia de Oliveira Prada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO CLÍLTON KRAÜSS DE
OLIVEIRA FERREIRA E ORIENTADA
PELO(A) PROF(A). DR(A). PATRÍCIA DE
OLIVEIRA PRADA.

LIMEIRA

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

F413e Ferreira, Clíilton Kraüss de Oliveira, 1983-
A exposição subcrônica a 1,2-NQ induz inflamação no tecido adiposo e altera a homeostase energética de camundongos via TNFR1 e TLR4 / Clíilton Kraüss de Oliveira Ferreira. – Limeira, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Patrícia de Oliveira Prada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Ar - Poluição. 2. Combustíveis diesel. 3. Naftoquinona. 4. Inflamação. I. Prada, Patrícia de Oliveira, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Subchronic exposure to 1,2-NQ induces adipose tissue inflammation and changes the energy homeostasis of mice via TNFR1 and TLR4

Palavras-chave em inglês:

Air pollution

Diesel fuels

Naphthoquinone

Inflammation

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento Humano e Esporte

Titulação: Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Patrícia de Oliveira Prada [Orientador]

Cláudio Alexandre Gobatto

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Alexandre Gabarra de Oliveira

Mariana Matera Veras

Data de defesa: 07-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0516-9991>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9017628383118285>

Folha de Aprovação

Autor (a): Clílton Kraüss de Oliveira Ferreira

Título: A exposição subcrônica a 1,2-NQ induz inflamação no tecido adiposo e altera a homeostase energética de camundongos via TNFR1 e TLR4.

Natureza: Tese

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento Humano e Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 07 de agosto de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Patrícia de Oliveira Prada (orientadora)
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Profª Drª Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira
Universidade Estadual Paulista

Profª Drª Mariana Matera Veras
Universidade de São Paulo

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha esposa Bruna e ao meu filho Enzo por toda a compreensão referente à minha necessidade pessoal de fechamento deste ciclo acadêmico e, mais uma vez, peço desculpas pela minha ausência física ao longo do caminho. Somente o tempo irá dizer se valeu à pena!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais (Manoel Gaspar e Ana Maria) e irmãos (Cléber e Cleiton) que me deram todo o suporte afetivo e societário, os quais fizeram esse processo possível.

Agradeço a minha orientadora (Prof^a Dr^a Patrícia de Oliveira Prada) por ter me aceitado no programa de doutorado sem me conhecer e prover todo o suporte intelectual e estrutural para a realização da tese.

Agradeço aos meus colegas de laboratório (Gisele, Paula, Laís, Olívia, Vitor, Clara, Raquel, Daisuke e Ana) pela manutenção das condições laboratoriais favoráveis ao desenvolvimento da pesquisa e produção do conhecimento.

Agradeço aos colaboradores intelectuais (Fernando Simabuco, Chadi Anaruma e Rodrigo Pereira) pela imensa ajuda nas análises laboratoriais e dos resultados.

Agradeço aos meus funcionários (Thaís, Mayara, Débora, Thalita, Enrico, Franciele, Caroline, Katlen, Bianca, Emilly, Ingrid, Pietro, Breno e Reinaldo) por desenvolverem com excelência as suas funções na empresa, tornando o meu tempo possível para dedicação parcial ao doutorado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por fomentar o programa de pós-graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo (CNEM).

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2017/18498-6, pelo apoio financeiro destinado ao nosso grupo de pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desta jornada!

RESUMO

Atualmente há evidências sugerindo uma relação entre poluição atmosférica e homeostase energética. No entanto, são poucas as pesquisas científicas sobre o que cada poluente provoca isoladamente. Essa tese de doutorado foi elaborada com o objetivo de investigar os efeitos da exposição subcrônica ao poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), proveniente da combustão do diesel, em baixa concentração, sobre a inflamação no tecido adiposo branco e o desequilíbrio da homeostase energética, verificando também o papel dos receptores TNFR1 e TLR4 nesse processo. Camundongos machos C57BL/6J e *knockouts* para o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1KO) e receptor do tipo *toll* 4 (TLR4KO), todos com 8 semanas de idade, receberam dieta padrão e foram expostos por nebulização ao veículo do poluente (controle) ou a 1,2-NQ por 17 semanas, 5 vezes por semana, 15 minutos por dia e concentração de 10 µg/m³ por exposição dentro da câmara de 600 cm². Nesse período foram analisados: massa e a composição corporal; ingestão alimentar; gasto energético; tolerância à insulina; tolerância à glicose; percentual de macrófagos totais, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal. Nos camundongos C57BL/6J, a exposição subcrônica a 1,2-NQ reduziu a ingestão alimentar cumulativa e aumentou a intolerância à glicose, a glicemia de jejum no período de 12 horas e o percentual de macrófagos M1 no tecido adiposo branco epididimal. Os organismos geneticamente modificados TNFR1KO e TLR4KO permaneceram protegidos da redução da ingestão alimentar cumulativa, da intolerância à glicose e dos aumentos na glicemia de jejum e percentual de macrófagos M1 observados no modelo experimental selvagem. De maneira inesperada, todas as linhagens expostas a 1,2-NQ aumentaram o gasto energético noturno e apresentaram maior tolerância à insulina.

Palavras-chave: poluição atmosférica; diesel; MP_{2,5}; 1,2-naftoquinona; inflamação; tecido adiposo branco; homeostase energética; macrófagos.

ABSTRACT

Currently, there is evidence suggesting a relationship between air pollution and energy homeostasis. However, the literature is unclear about the effects of each pollutant by itself. This doctoral thesis was developed with the objective of investigating the subchronic exposure effects to the atmospheric chemical pollutant 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), caused by low-concentration diesel combustion on the white adipose tissue inflammation and energy homeostasis imbalance, also verifying the role of TNFR1 and TLR4 in this process. C57BL/6J male mice and knockouts for tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1KO) and toll-like receptor 4 (TLR4KO), all at 8 weeks of age, received commercial standard diet chow and were exposed by nebulization to the vehicle of the pollutant (control) or 1,2-NQ for 17 weeks, 5 times a week, 15 minutes per day and 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ of concentration inside the 600 cm^2 chamber. In this period, we analyzed: body mass; food intake; energy expenditure; insulin tolerance; glucose tolerance; the percentage of M1 and M2 macrophages into the epididymal adipose tissue. In the C57BL/6J mice, subchronic exposure to 1,2-NQ reduced cumulative food intake and increased glucose intolerance, fasting glucose for 12 hours, and the percentage of M1 macrophages in epididymal white adipose tissue. Genetically modified organisms TNFR1KO and TLR4KO remained protected from reduced food intake, glucose intolerance, increased fasting blood glycemia and increased the percentage of M1 macrophages observed in the wild-type experimental model. Unexpectedly, all lineages exposed to 1,2-NQ increased nocturnal energy expenditure and showed higher insulin tolerance.

Keywords: Air pollution; diesel; $\text{PM}_{2.5}$; 1,2-naphthoquinone; inflammation; white adipose tissue; homeostasis energy; macrophages.

RESUMEN

Actualmente hay evidencias que sugieren una relación entre contaminación atmosférica y homeostasis energética. Sin embargo, son pocas las investigaciones científicas sobre lo que cada contaminante provoca aisladamente. Esta tesis de doctorado fue elaborada con el objetivo de investigar los efectos de la exposición subcrónica al contaminante químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), proveniente de la combustión del diesel, en baja concentración, sobre la inflamación en el tejido adiposo blanco y el desequilibrio de la homeostasis energética, verificando también el papel de los receptores TNFR1 y TLR4 en ese proceso. Los ratones machos C57BL/6J y los *knockouts* para el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1KO) y receptor del tipo *toll* 4 (TLR4KO), todos con 8 semanas de edad, recibieron dieta estándar y fueron expuestos por nebulización al vehículo del contaminante (control) o a 1,2-NQ durante 17 semanas, 5 veces por semana, 15 minutos al día y una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por exposición dentro de la cámara de 600 cm^2 . En ese período fueron analizados: masa y la composición corporal; ingesta de alimentos; gasto energético; tolerancia a la insulina; tolerancia a la glucosa; porcentaje de macrófagos totales, M1 y M2 en el tejido adiposo epididimal. En los ratones C57BL/6J, la exposición subcrónica a 1,2-NQ redujo la ingesta alimentaria acumulativa y aumentó la intolerancia a la glucosa, la glucemia de ayuno en el período de 12 horas y el porcentaje de macrófagos M1 en el tejido adiposo blanco epididimal. Los organismos genéticamente modificados TNFR1KO y TLR4KO permanecieron protegidos de la reducción de la ingesta alimentaria acumulativa, de la intolerancia a la glucosa, de los aumentos en la glucemia de ayuno y porcentual de macrófagos M1 observados en el modelo experimental salvaje. De manera inesperada, todos los linajes expuestos a 1,2-NQ aumentaron el gasto energético nocturno y presentaron mayor tolerancia a la insulina.

Palabras clave: contaminación atmosférica; diesel; $\text{MP}_{2,5}$; 1,2-naftoquinona; inflamación; tejido adiposo blanco; homeostasis energética; macrófagos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Desenho experimental</i>	29
Figura 2. <i>Exposição dos camundongos ao poluente 1,2-NQ</i>	32
Figura 3. <i>Organização dos grupos e subgrupos experimentais</i>	34
Figura 4. <i>Calorímetro Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus</i>	35
Figura 5. <i>Análise da composição corporal por tomografia computadorizada (CT)</i>	36
Figura 6. <i>Massa corporal cumulativa dos camundongos C57BL/6J</i>	40
Figura 7. <i>Ingestão alimentar cumulativa dos camundongos C57BL/6J</i>	41
Figura 8. <i>Gasto energético dos camundongos C57BL/6J</i>	42
Figura 9. <i>Teste de tolerância à insulina (ITT) dos camundongos C57BL/6J</i>	43
Figura 10. <i>Teste de tolerância à glicose (GTT) e glicemia de jejum dos camundongos C57BL/6J</i>	44
Figura 11. <i>Composição corporal por tomografia computadorizada MicroPet-CT</i>	45
Figura 12. <i>Perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal</i>	47
Figura 13. <i>Massa corporal cumulativa dos camundongos geneticamente modificados</i>	49
Figura 14. <i>Ingestão alimentar cumulativa dos camundongos geneticamente modificados</i>	51
Figura 15. <i>Gasto energético dos camundongos geneticamente modificados</i>	53
Figura 16. <i>Teste de tolerância à insulina (ITT) dos camundongos geneticamente modificados</i>	55
Figura 17. <i>Teste de tolerância à glicose (GTT) dos camundongos geneticamente modificados</i>	57
Figura 18. <i>Composição corporal por tomografia computadorizada de alta resolução MicroPet-CT dos camundongos geneticamente modificados</i>	59
Figura 19. <i>Perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal dos camundongos geneticamente modificados</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Estratégia de controle e de gate no citômetro de fluxo para a análise do número total de macrófagos (F4/80), M1 (CD11c) e M2 (CD206) provenientes do tecido adiposo branco epididimal.....38*

Tabela 2. *Resumo dos resultados fisiológicos referentes a homeostase energética e perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal.....63*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[NQ]	Concentração da Solução do Poluente
1,2-NQ	1,2-naftoquinona
AUC	Área sob a Curva
ACK	Cloreto de Amônio-Potássio
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AMPK	Proteína Cinase Ativada por AMP
BAT	Tecido Adiposo Marrom
BSA	Albumina do Soro Bovino
CCAC	Manual Canadense de Cuidado Animal
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
clAP 1	Proteína 1 Inibidora Celular de Apoptose
clAP 2	Proteína 2 Inibidora Celular de Apoptose
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CLAMS	Sistema de Monitoramento de Camundongos por Calorimetria Indireta
CONCEA	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CT	Tomografia Computadorizada
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FACS	Classificação de Células Ativadas por Fluorescência
FBS	Soro Fetal Bovino
EPM	Erro Padrão da Média
FMO	Fluorescência Menos Um
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPA	Hidrocarboneto Aromático Policíclico
HSP70	Proteína do Choque Térmico 70

IB	Instituto de Biologia
IFN- γ	Interferon Gama
IKK- β	Ikappa Cinase Beta
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 com Glicoproteína Heterodimérica de 70kDa
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
IR	Receptor de Insulina
IRSs	Substratos do Receptor de Insulina
IRS1	Substrato do Receptor de Insulina 1
IRS2	Substrato do Receptor de Insulina 2
JNK	C-jun N-terminal Cinase
LabIMO	Laboratório de Investigação Molecular em Obesidade
LPS	Lipopolissacárideo
M1	Macrófagos com o Perfil Pró-inflamatório
M2	Macrófagos com o Perfil Anti-inflamatório
MCP-1	Proteína Quimioatratadora de Monócitos Número 1
Mecp2	Proteína de Ligação a Metil-CpG 2
Mnq	Massa de 1,2-NQ Nebulizada dentro da Câmara
MP	Material Particulado
MP ₁₀	Material Particulado com diâmetro inferior a 10 μ m
MP _{2,5}	Material Particulado com diâmetro inferior a 2,5 μ m
MPUF	Material Particulado Ultra Fino com diâmetro inferior a 0,1 μ m
MTAs	Macrófagos do Tecido Adiposo
Mwnq	Peso Molecular da 1,2-NQ (158,15 g/mol)
MyD88	Proteína Adaptadora de Diferenciação Mieloide 88
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NOx	Óxido de Nitrogênio
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
OH•	Radical Hidroxila
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PED	Partículas de Exaustão do Diesel

PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase 1B
RER	Razão de Troca Respiratória
RIP1	Proteína 1 de Interação com o Receptor Serina Treonina Cinase
SNC	Sistema Nervoso Central
TLR4	Receptor do Tipo <i>Toll</i> 4
TLR4KO	Camundongo <i>Knockout</i> para o Receptor do Tipo <i>Toll</i> 4
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR1KO	Camundongo <i>Knockout</i> para o Receptor 1 de TNF Alfa
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRADD	Proteína Associada ao Receptor de TNF com um Domínio de Morte
TRAF2	Fator 2 Associado ao Receptor de TNF
Tween	Polisorbato
UCP	Proteína de Desacoplamento
UCP1	Proteína de Desacoplamento 1
VCO ₂	Volume Gás Carbônico - Produção
VO ₂	Volume de Oxigênio - Consumo
Vsol	Volume da Solução do Poluente Localizado no Copo do Nebulizador
WAT	Tecido Adiposo Branco

LISTA DE SÍMBOLOS

↑	Aumento em relação ao controle ($p < 0,05$)
↓	Redução em relação ao controle ($p < 0,05$)
-	Sem alterações estatisticamente significantes ($p > 0,05$)
*	$p < 0,05$ na comparação entre animais da mesma linhagem expostos a 1,2-NQ e ao veículo do poluente
#	$p < 0,05$ na comparação das linhagens TNFR1KO ou TLR4KO <i>versus</i> C57BL/6J
NQ	Grupo exposto ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ
VC	Grupo exposto somente ao veículo do poluente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e seus efeitos inflamatórios.....	22
1.2 O papel do receptor do tipo <i>toll</i> 4 (TLR4) e do receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1).....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 HIPÓTESES.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Desenho experimental.....	29
4.2 Experimentos pré-eutanásia.....	30
4.2.1 Procedência, manutenção e controle da massa corporal e ingestão alimentar.....	30
4.2.2 Exposição dos camundongos ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ.....	31
4.2.3 Grupos experimentais.....	33
4.2.4 Gasto energético.....	35
4.2.5 Composição corporal.....	36
4.2.6 Teste de tolerância à insulina (ITT).....	37
4.2.7 Teste de tolerância à glicose (GTT).....	37
4.3 Experimentos pós-eutanásia.....	37
4.3.1 Percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal por citometria de fluxo.....	37
4.4 Análise estatística.....	39

5 RESULTADOS.....	40
5.1 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a massa corporal em camundongos C57BL/6J.....	40
5.2 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a ingestão alimentar em camundongos C57BL/6J.....	41
5.3 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o gasto energético em camundongos C57BL/6J.....	42
5.4 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o ITT em camundongos C57BL/6J.....	43
5.5 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o GTT em camundongos C57BL/6J.....	44
5.6 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a composição corporal em camundongos C57BL/6J.....	45
5.7 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 anti-inflamatórios no tecido adiposo branco epididimal em camundongos C57BL/6J	46
5.8 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a massa corporal em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	48
5.9 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a ingestão alimentar em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	50
5.10 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o gasto energético em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	52
5.11 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o ITT em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	54
5.12 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o GTT em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	56
5.13 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a composição corporal em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	58

5.14 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal em camundongos <i>knockouts</i> para TNFR1 e TLR4.....	60
5.15 Resumo dos resultados fisiológicos e perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal.....	62
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	77
Anexo 1 Declaração de que a tese de doutorado não infringe os dispositivos da lei nº 9.610/98.....	77
Anexo 2 Declaração referente a bioética e biossegurança.....	78
Anexo 3 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP.....	79
Anexo 4 Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA.....	80
Anexo 5 Certificado de conclusão do curso - Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório – IB/CEUA/UNICAMP.....	81
Anexo 6 Comprovante de submissão de artigo científico em revista indexada.....	82

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento rápido da queima de combustíveis fósseis para a geração de energia e transporte, a poluição atmosférica destaca-se como o maior fator de risco à saúde em muitos países desenvolvidos. Os níveis de poluentes em muitas cidades do mundo frequentemente excedem os padrões regulatórios atuais. O material particulado (MP) é uma mistura de partículas líquidas e sólidas em suspensão no ar. Sua composição e tamanho dependem das fontes de emissão (ALI et al., 2018). Em geral, as partículas maiores têm diâmetros entre 2,5 e 30 μm e são chamadas de “grosseiras” (*coarse mode*), enquanto partículas menores apresentam diâmetros inferiores a 2,5 μm e são chamadas de “finas” (*fine mode*). Os MPs grosseiros são provenientes de combustões descontroladas, dispersão mecânica do solo ou de outros materiais da crosta terrestre e contém em maior grau silício, titânio, alumínio, ferro, sódio e cloro. Os MPs finos são derivados da combustão de fontes móveis e estacionárias, como automóveis, incineradores e termoeletricas. Entre seus principais componentes encontram-se o carbono, chumbo, vanádio, bromo e os óxidos de enxofre e nitrogênio (BRAGA et al., 2001).

Segundo Block e Calderon-Garciduenas (2009), os materiais particulados com dimensões inferiores a 2,5 μm (MP_{2,5}) podem acessar o organismo principalmente por via alveolar e pelo bulbo olfatório. No bulbo olfatório, o MP_{2,5} e os materiais particulados ultra finos (MPUF) podem acessar diretamente o cérebro, sendo estes poluentes reconhecidos pelas micróglia que os fagocitam e produzem citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral, causando neuroinflamação. Os mesmos autores ainda relatam que cronicamente esse processo mediado pelas micróglia recebe o nome de microgliose reativa e libera principalmente interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (EROs), tratando-se assim, de um quadro de neurotoxicidade causado por poluição atmosférica (BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009).

O MP_{2,5} é apontado como uma convenção de poluentes mais frequentemente relacionada com danos à saúde, principalmente por atingir as vias respiratórias inferiores, onde ocorrem as trocas gasosas no pulmão (ALI et al., 2018). Nas porções mais distais das vias aéreas, o MP_{2,5} é fagocitado pelos macrófagos alveolares, sendo então removido pelo sistema linfático numa exposição aguda, porém na exposição subcrônica ao MP_{2,5} ocorre o comprometimento dessa

resposta imune inata mediada por macrófagos alveolares com subsequente inflamação dos alvéolos, permitindo assim a translocação do MP_{2,5} para a circulação sistêmica (LUO et al., 2017). Esses efeitos induzem várias respostas celulares imunitárias inatas e adaptativas, incluindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Elevações nas concentrações sistêmicas e pulmonares de interleucina 6 (IL-6) e do TNF- α , tipicamente correlacionadas com inflamação pulmonar, têm sido observadas em humanos após a exposição crônica ao MP (LI; ZHOU; ZHANG, 2018). A via alveolar de inflamação por MP_{2,5}, consiste num processo subcrônico de exposição com possível translocação desses poluentes particulados na corrente sanguínea, existindo então a entrada de citocinas pró-inflamatórias e MP_{2,5} proveniente da inflamação pulmonar que atingem diversos órgãos e tecidos, podendo causar desequilíbrio da homeostase energética. (AN et al., 2018; BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009; USTULIN et al., 2018).

Atualmente, a poluição atmosférica, principalmente devido ao MP_{2,5} tem sido descrita como capaz de alterar a massa corporal, ingestão alimentar e gasto energético, podendo ter relação com doenças metabólicas (AN et al., 2018; DA SILVEIRA et al., 2018; MAZIDI; SPEAKMAN, 2017; USTULIN et al., 2018). Em recente revisão sistemática de 66 relatos de associação entre poluição atmosférica e peso corporal, 44% obtiveram associação positiva, 44% associação nula e 12% associação negativa, sugerindo que dependendo do tipo e concentração dos poluentes pode haver diferentes respostas e adaptações na massa corporal total (AN et al., 2018). Nesse sentido, um estudo com camundongos submetidos a 5 meses de exposição ao MP_{2,5} concentrado acima dos valores aceitos (52,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), houve manutenção do peso corporal com redução da ingestão alimentar, sugerindo queda no gasto energético devido à redução da proteína de desacoplamento 1 (UCP1) observada no tecido adiposo marrom (HU et al., 2017). Outra pesquisa realizada em camundongos mostrou que alterações de peso corpóreo resultantes da exposição à exaustão do diesel foram associadas à neuroinflamação em áreas relacionadas à cognição e emoção, sugerindo que a poluição atmosférica pode alterar a homeostase energética via sistema nervoso central (BOLTON et al., 2012).

O hipotálamo é considerado como região integradora dos sinais neurais, hormonais e nutricionais para que haja o controle da fome e da saciedade (ELMQUIST; SCHERER, 2012). A poluição atmosférica pode alterar a resposta hormonal ao estresse devido a sua ação no sistema hipotálamo-pituitária-adrenal

(KODAVANTI, 2016). Outro possível fator para a alteração da homeostase energética pela poluição atmosférica seria a capacidade dos poluentes alterarem o gasto energético (MCCONNELL et al., 2016). Em recente estudo realizado com camundongos expostos ao $MP_{2,5}$ por 5 e 8 semanas, foram observadas reduções no gasto energético nos períodos claro e escuro (LIU et al., 2014b).

Apesar das pesquisas em seres humanos mostrarem a correlação positiva entre poluição atmosférica e desequilíbrio na homeostase energética, aspectos de homogeneidade dos grupos estudados, como sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), nível de atividade física, densidade demográfica, dieta e dados socioeconômicos podem ser fatores de confusão para a interpretação dos resultados.

Com isso, poucos estudos foram criteriosos no controle das múltiplas variáveis supracitadas. Dentre os estudos criteriosos, destaca-se o realizado com 374 crianças, em várias cidades iranianas com altos níveis de MP_{10} (média de $150 \mu g/m^3$), sendo as variáveis de idade, sexo, IMC, circunferência do quadril, dieta e atividade física controladas. Os resultados mostraram elevadas concentrações de marcadores inflamatórios no plasma, estresse oxidativo e resistência à insulina nesta população (KELISHADI et al., 2009).

Por outro lado, pesquisas realizadas em modelos animais demonstraram elevações nas concentrações de glicose sanguínea, gordura visceral e subcutânea após a exposição ao $MP_{2,5}$ em camundongos alimentados com dieta padrão (LIU et al., 2013; SUN et al., 2009; XU et al., 2011a). Diante dos fatos expostos, os mecanismos biomoleculares envolvidos nas anormalidades periféricas parecem estar relacionados com a inflamação causada pela exposição ao $MP_{2,5}$.

A diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por concentrações plasmáticas de glicose elevadas, resistência à insulina e deficiência de sua secreção pela célula beta pancreática (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019). A poluição atmosférica, principalmente na sua forma mais estudada, o $MP_{2,5}$, desempenha um papel importante na disfunção metabólica, sugerindo que a exposição subcrônica aos poluentes do ar pode comprometer a sinalização da insulina, metabolismo da glicose e função da célula beta pancreática, contribuindo assim, para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (ALDERETE et al., 2018). Um estudo em adultos chineses expostos ao $MP_{2,5}$ ($41,1 \mu g/m^3$) mostrou que essa população apresentou glicemia de jejum elevada (LIU et al., 2016). Outro estudo realizado em mulheres

alemãs expostas aos poluentes dióxido de nitrogênio (NO₂) e óxido de nitrogênio (NO_x) mostrou intolerância à glicose evidenciada por níveis de glicemia entre 140-199 mg/dL após 2 horas da ingestão de glicose durante o teste de tolerância a glicose (TEICHERT et al., 2013).

A exposição aos poluentes do ar pode também causar aumento da inflamação do tecido adiposo (SUN et al., 2009). Nesse sentido, a exposição subcrônica ao MP_{2,5} leva a inflamação do tecido adiposo visceral e causa estresse oxidativo com alterações na concentração de adipocinas circulantes que regulam a homeostase energética, incluindo adiponectina e leptina (XU et al., 2011a, 2011b). Durante esse processo, os macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco podem ser primariamente responsáveis pela inflamação acionada por MP_{2,5} (MENDEZ et al., 2013). Um estudo realizado em camundongos machos C57BL/6J, alimentados com dieta hiperlipídica, por 10 semanas e depois expostos ao MP_{2,5} durante 24 semanas mostrou que além da resistência à insulina e aumento da massa adiposa, a poluição atmosférica potencializou a inflamação adiposa, aumentando a quantidade de macrófagos F4/80+ além de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo epididimal e redução da citocina antiinflamatória interleucina 10 (IL-10), sugerindo que o MP_{2,5} exacerba a resistência à insulina devido à inflamação causada pelos macrófagos do tecido adiposo (MTAs) (SUN et al., 2009). MTAs são derivados de monócitos circulantes que são recrutados por meio do endotélio em resposta a estímulos inflamatórios e obesidade, também sendo necessários para o desenvolvimento de resistência à insulina em modelos animais de obesidade genética ou induzida por dieta (NISHIMURA et al., 2008). Acredita-se que o comprometimento da função endócrina e metabólica do tecido adiposo desempenhe um papel-chave no desequilíbrio da homeostase energética, o que é característico de distúrbios, como obesidade e diabetes tipo 2 (MENDEZ et al., 2013).

1.1 Poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e seus efeitos inflamatórios

Inflamações no organismo em resposta ao MP_{2,5} existente em ambientes poluídos representam um mecanismo comum que pode interagir com outras variáveis inflamatórias decorrentes da nutrição e do estilo de vida, modulando a susceptibilidade para doenças metabólicas (LIU et al., 2013). Sabe-se que o Brasil

consome cerca de 35 milhões de toneladas de óleo diesel por ano (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005). Grande parte do MP_{2,5} é composta por partículas de exaustão do diesel (PED) (VAN BERLO; HULLMANN; SCHINS, 2012). Um estudo realizado na cidade de Hong-Kong, em vias de tráfego urbano, encontrou 27 poluentes químicos atmosféricos associados às PEDs (HO et al., 2002). Nesse sentido, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB), no ano de 2002, revelou que a frota de 5,9% de veículos automotores movidos a diesel foi responsável pela emissão 77% de MP na região metropolitana de São Paulo. As PEDs são formadas por um núcleo de carbono e várias substâncias químicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), estando presentes em grandes concentrações no ambiente. No organismo humano, elas penetram nas vias aéreas inferiores, agindo como carreadores de compostos químicos orgânicos específicos, como as quinonas (INOUE et al., 2007).

As quinonas são encontradas principalmente como ligantes químicos das PEDs em regiões de tráfego urbano (BOLTON et al., 2000). O excesso de PEDs está associado ao aumento de danos à saúde. As quinonas produzidas pela combustão do diesel são conhecidas por possuírem propriedades tóxicas e induzirem o estresse oxidativo e peroxidação lipídica (BRUNMARK; CADENAS, 1989; LIN et al., 2007; SHINKAI et al., 2012). O composto químico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) proveniente da combustão do diesel é derivado do naftaleno e gerado pela reação com compostos derivados do meio ambiente. Nos motores movidos a diesel, o naftaleno sofre ação de auto-oxidação não enzimática no processo de combustão, transformando-se em 1,2-NQ. Em contato com o organismo humano, a 1,2-NQ leva à formação do radical hidroxila (OH•), que atua como potente agente oxidante, capaz de causar danos em macromoléculas essenciais, como os lipídeos e proteínas, comprometendo a integridade e a funcionalidade celular e podendo desencadear apoptose (BOLTON et al., 2000; KUMAGAI et al., 2002; LIN et al., 2005).

Evidências epidemiológicas mostram que indivíduos vivendo em áreas de tráfego urbano intenso são expostos a altas concentrações de PEDs. A 1,2-NQ está presente em concentrações significantes nas partículas de exaustão veiculares e em amostras do ar ambiente, sendo que aproximadamente 13,7 µg de 1,2-NQ incorporam-se a cada grama de PED (CHO et al., 2004; SANTOS et al., 2014). Essas exposições podem promover o desencadeamento de reações inflamatórias

locais e sistêmicas devido à absorção de compostos químicos suspensos na atmosfera, tornando-as tóxicas (SANDSTROM; NOWAK; VAN BREE, 2005). Nesse sentido, um estudo mostrou que a adição de baixas concentrações da quinona 1,2-NQ à suspensão de PED, quando administradas pela via intratraqueal de ratos, resultou em maior extravasamento plasmático e influxo de leucócitos no espaço alveolar, sugerindo que este composto químico atua como um dos principais agentes lesivos contidos nas PEDs em vias aéreas de roedores (COSTA et al., 2010). Recentemente, algumas pesquisas têm mostrado que a 1,2-NQ aumentou a produção H_2O_2 e expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6 e TNF- α em células pulmonares humanas (LAVRICH et al., 2018; SHENG; LU, 2017).

Atualmente, é de conhecimento geral a existência de vários poluentes nocivos à saúde, porém, as pesquisas científicas sobre o que cada composto tóxico provoca isoladamente ainda são pouco informativas. Embora o $MP_{2,5}$ esteja correlacionado com o desequilíbrio da homeostase energética, não há evidências se o poluente químico atmosférico 1,2-NQ está associado com esse fenômeno e pouco se sabe, até o momento, sobre o seu efeito isolado na saúde humana. Utilizamos neste estudo um modelo experimental que mimetiza as condições de exposição de um indivíduo adulto à baixa concentração de 1,2-NQ, um dos contaminantes das PEDs, e investigamos os efeitos dessa exposição na massa corporal, ingestão alimentar e gasto energético. Também investigamos os efeitos metabólicos e imunológicos, analisando a tolerância à insulina, tolerância à glicose e o percentual de macrófagos com perfil inflamatório (M1) no tecido adiposo branco após exposição subcrônica ao poluente 1,2-NQ.

1.2 O papel do receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) e do receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1)

O $MP_{2,5}$ é composto por partículas suspensas no ar, incluindo, sulfatos, nitratos, amônia, carbonos, íons de hidrogênio, LPS (lipopolissacarídeos), metais e água (BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009; VERAS et al., 2010). A exposição ao $MP_{2,5}$ pode induzir a inflamação crônica de alguns tecidos periféricos (SUN et al., 2009). Entretanto, ainda não está claro, se a exposição subcrônica à poluição pode desencadear a inflamação subclínica e se esses efeitos levariam ao desenvolvimento de desequilíbrio da homeostase energética.

Uma das correlações entre poluição e homeostase energética seria o aumento da inflamação por meio da ativação dos receptores TLR4 da imunidade inata. Um agonista importante do TLR4 e também parte integrante do MP_{2,5} é o LPS (BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009; VERAS et al., 2010). Por ligação principalmente do LPS ao TLR4, a proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é recrutada para o TLR4, essa interação, dispara uma cascata de sinalização a jusante, levando a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), e consequentemente, a transcrição de genes pró-inflamatórios que codificam citocinas como TNF- α , quimiocinas e outros efetores da resposta imune inata (KUZMICH et al., 2017).

Em termos moleculares, as PEDs podem ativar a via NF- κ B principalmente pela estimulação do TLR4 nas vias aéreas de camundongos (TAKANO et al., 2002). As quinonas presentes nas PEDs em contato com o organismo produzem EROs, promovendo dano celular e estimulando a formação de proteínas de choque térmico, como por exemplo, HSP70, que atuam como agonistas do TLR4, iniciando o recrutamento da molécula MyD88 que, subsequentemente estimula a cascata de sinalização intracelular e ativa a via NF- κ B, aumentando a transcrição de genes pró-inflamatórios (CHUNG et al., 2008; JOHNSON; BRUNN; PLATT, 2004; QUINTANA; COHEN, 2005; SANTOS et al., 2014). Com isso, levanta-se a possibilidade de que a exposição subcrônica a 1,2-NQ possa ativar a via molecular do TLR4, induzindo inflamação subclínica, favorecendo o desequilíbrio da homeostase energética.

Como efeito colateral da tentativa do sistema imunitário em remover os artefatos provenientes da inalação de poluentes atmosféricos, o TNF- α produzido causa inflamação sistêmica, pois praticamente todos os tecidos do nosso organismo possuem receptores para esta citocina (BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009). Nesse sentido, o TNF- α se liga ao TNFR1 e recruta a proteína 1 de interação com o receptor serina treonina quinase (RIP1) e a proteína associada ao receptor de TNF com um domínio de morte (TRADD). Logo, ocorre o recrutamento do complexo composto pelo fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2) e pela proteína 1 ou 2 inibidora celular de apoptose (cIAP 1/2) até a extremidade final da TRADD já acoplada ao TNFR1. A formação desse complexo protéico dispara uma cascata de sinalização, levando também a ativação da via inflamatória NF- κ B já descrita anteriormente (WAJANT; SCHEURICH, 2011).

Com base no conteúdo supracitado, o TLR4 e o TNFR1 podem representar alvos de inflamação quando a população é exposta ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ. Nossa hipótese nessa tese foi que a exposição subcrônica a 1,2-NQ ativa o TLR4 e o TNFR1 *in vivo* levando à inflamação periférica, podendo contribuir para o desequilíbrio da homeostase energética por meio de alterações na massa corporal, ingestão alimentar e gasto energético. Nesse sentido, o uso de camundongos transgênicos que não expressam TLR4 e TNFR1 poderia atenuar os efeitos do poluente, protegendo o animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da exposição subcrônica ao poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), proveniente da combustão do diesel, em baixa concentração, sobre a homeostase energética e o perfil inflamatório do tecido adiposo branco em camundongos adultos C57BL/6J e *knockouts* para o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1KO) e receptor do tipo *toll* 4 (TLR4KO).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente os efeitos causados pela exposição subcrônica pela via inalatória ao poluente 1,2-NQ ou solução veículo em camundongos C57BL/6J sobre a massa corporal, ingestão alimentar e gasto energético. Também esclarecer se há diferença nos animais TNFR1KO e TLR4KO;
- Avaliar comparativamente os efeitos causados pela exposição subcrônica pela via inalatória ao poluente 1,2-NQ ou solução veículo em camundongos C57BL/6J sobre a resistência à insulina e tolerância à glicose. Também esclarecer se há diferença nos animais TNFR1KO e TLR4KO;
- Avaliar comparativamente os efeitos causados pela exposição subcrônica pela via inalatória ao poluente 1,2-NQ ou solução veículo em camundongos C57BL/6J sobre o percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal. Também esclarecer se há diferença nos animais TNFR1KO e TLR4KO.

3 HIPÓTESES

Conforme conteúdo introdutório supracitado, a poluição atmosférica por meio do MP_{2,5} pode promover inflamação no sistema nervoso central e na periferia, resistência à insulina, hiperglicemia e aumento de gordura visceral. Grande parte do MP_{2,5} é formada pelas PEDs e alguns HPAs têm como função carrear quinonas para as vias respiratórias inferiores, causando estresse oxidativo, peroxidação lipídica e apoptose. Contudo, não se sabe o efeito isolado de cada poluente pertencente ao MP_{2,5} e ainda não está claro se a exposição subcrônica a 1,2-NQ poderia desencadear a inflamação subclínica e se esses efeitos levariam ao desenvolvimento de desequilíbrio da homeostase energética, metabólica e imunológica. Portanto, em hipótese, a 1,2-NQ atuaria então como agente lesivo nas exposições subcrônicas, desencadeando reações inflamatórias sistêmicas e promovendo alterações na massa corporal, ingestão alimentar, gasto energético, tolerância à insulina, tolerância à glicose e perfil inflamatório de macrófagos do tecido adiposo branco em camundongos C57BL/6J. Em complemento, conforme a introdução da tese, o TLR4 e o TNFR1 poderiam representar alvos de inflamação subclínica quando expostos ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ. Nesse sentido, espera-se que os camundongos geneticamente modificados que não expressam TLR4 e TNFR1 não apresentem os efeitos da exposição ao poluente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Todos os camundongos utilizados nessa tese, selvagens e geneticamente modificados, passaram pelo mesmo desenho experimental, sendo a primeira semana com coleta de dados basais de massa corporal e ingestão alimentar. As dezessete semanas subsequentes, houve a inserção das exposições ao veículo/1,2-NQ. Ao longo do tempo denominado como período pré-eutanásia, análises pontuais do gasto energético, teste de tolerância à insulina (ITT), teste de tolerância à glicose (GTT) e composição corporal foram realizadas. Na décima oitava semana de experimentos, os animais foram eutanasiados e os dados de massa e perfil inflamatório do tecido adiposo epididimal foram analisados (FIGURA 1).

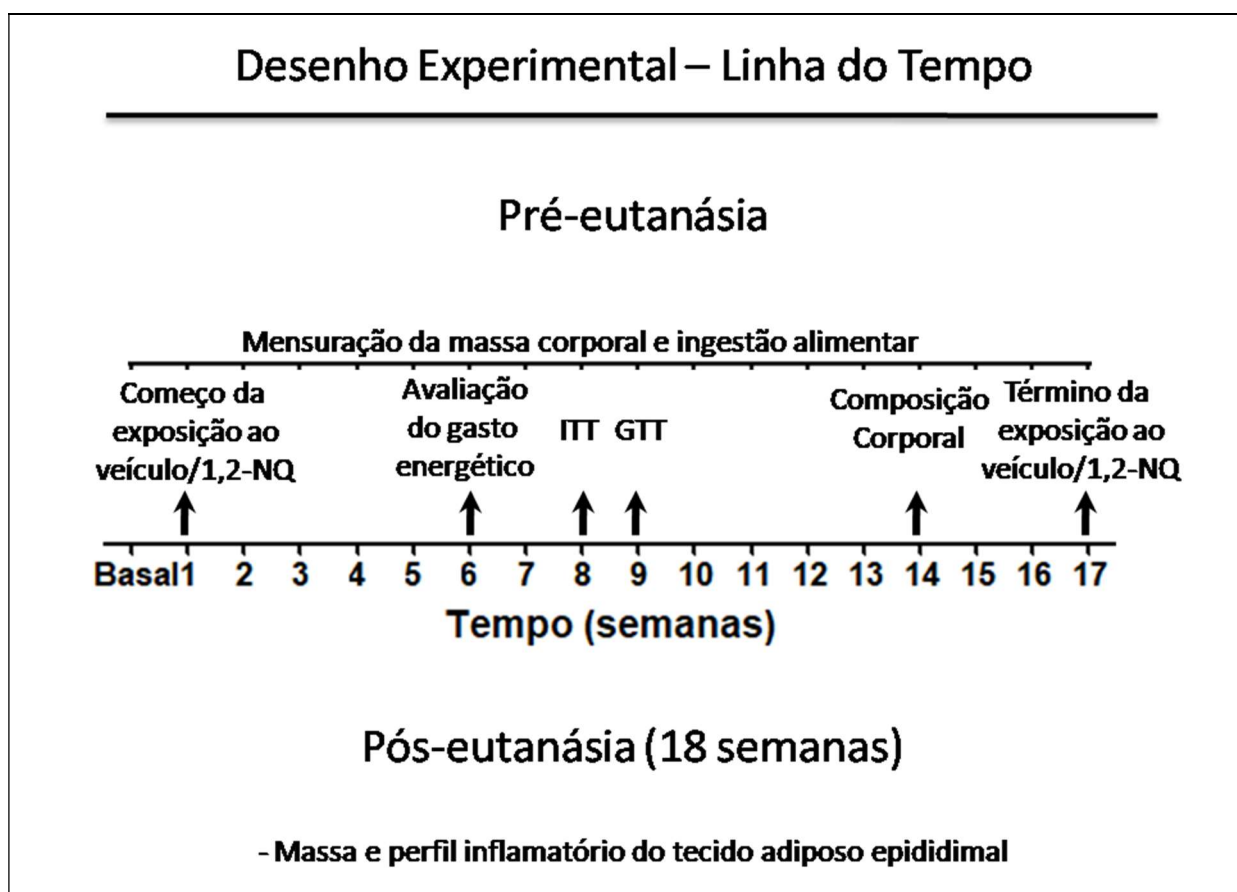


Figura 1. *Desenho experimental.* Ordem cronológica das exposições e análises laboratoriais. 17 semanas de exposição ao veículo/1,2-NQ com coleta de dados de massa corporal e ingestão alimentar. Período pré-eutanásia: avaliação do gasto energético (semana 6); ITT (semana 8); GTT (semana 9); composição corporal (semana 14). Período pós-eutanásia: massa e perfil inflamatório do tecido adiposo epididimal (semana 18).

4.2 Experimentos pré-eutanásia

4.2.1 Procedência, manutenção e controle da massa corporal e ingestão alimentar

Foram utilizados camundongos machos saudáveis, com 8 semanas de idade e massa corporal média de 20-30g. As linhagens C57BL/6J e TLR4KO foram obtidas do Cemib/UNICAMP e a linhagem TNFR1KO do Biotério/USP de Ribeirão Preto. Os organismos geneticamente modificados (OGMs) foram *knockouts* totais com *background* nos camundongos C57BL/6J. Todas as linhagens foram alojadas em gaiolas individuais, em estantes ventiladas (22-23° C) e ciclo normal (claro 12 h / escuro 12 h). A limpeza das gaiolas e a troca da maravalha foram realizadas uma vez por semana. Houve o controle da massa corporal e da ingestão alimentar 5 dias por semana e a média foi utilizada para compor o valor semanal, mantendo sempre a gaiola com 20 g de dieta padrão Nuvilab®. A água filtrada foi fornecida à vontade. Para os cálculos da evolução da massa corporal e ingestão alimentar foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{-Massa Corporal - } \Delta\% = [(massa \text{ final} - massa \text{ inicial} / massa \text{ inicial}) \times 100];$$

$$\text{-Ingestão Alimentar - } \Delta\% = [(ingestão \text{ final} - ingestão \text{ inicial} / ingestão \text{ inicial}) \times 100].$$

Após 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, os animais passaram por 5 dias de descanso e foram eutanasiados por decapitação para a coleta de células e tecidos.

Os experimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 4628-1) e pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio protocolo 2016/01) com Certificação de Qualidade em Biossegurança (CQB: 370), estando também de acordo com as diretrizes do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXOS 3 e 4).

4.2.2 Exposição dos camundongos ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ

O composto químico 1,2-NQ foi obtido da empresa Sigma™ (St. Louis, MO, USA). Sempre 4 ou 5 animais foram inseridos em uma câmara de polietileno, com área de superfície de 600 cm², conforme dimensões propostas pelo Manual Canadense de Cuidado Animal (CCAC, 1993). A lateral esquerda da cuba tinha um orifício com 1,5 cm para saída de ar, enquanto a direita possuía um conector de polietileno de 2,0 cm, que esteve acoplado ao inalador ultrassônico (Mod. Respiramax; NS®, São Paulo, Brasil), cuja capacidade de nebulização corresponde ao volume de 1 mL/min e, aproximadamente, 3 % de perda (FIGURA 2) (SANTOS et al., 2014).

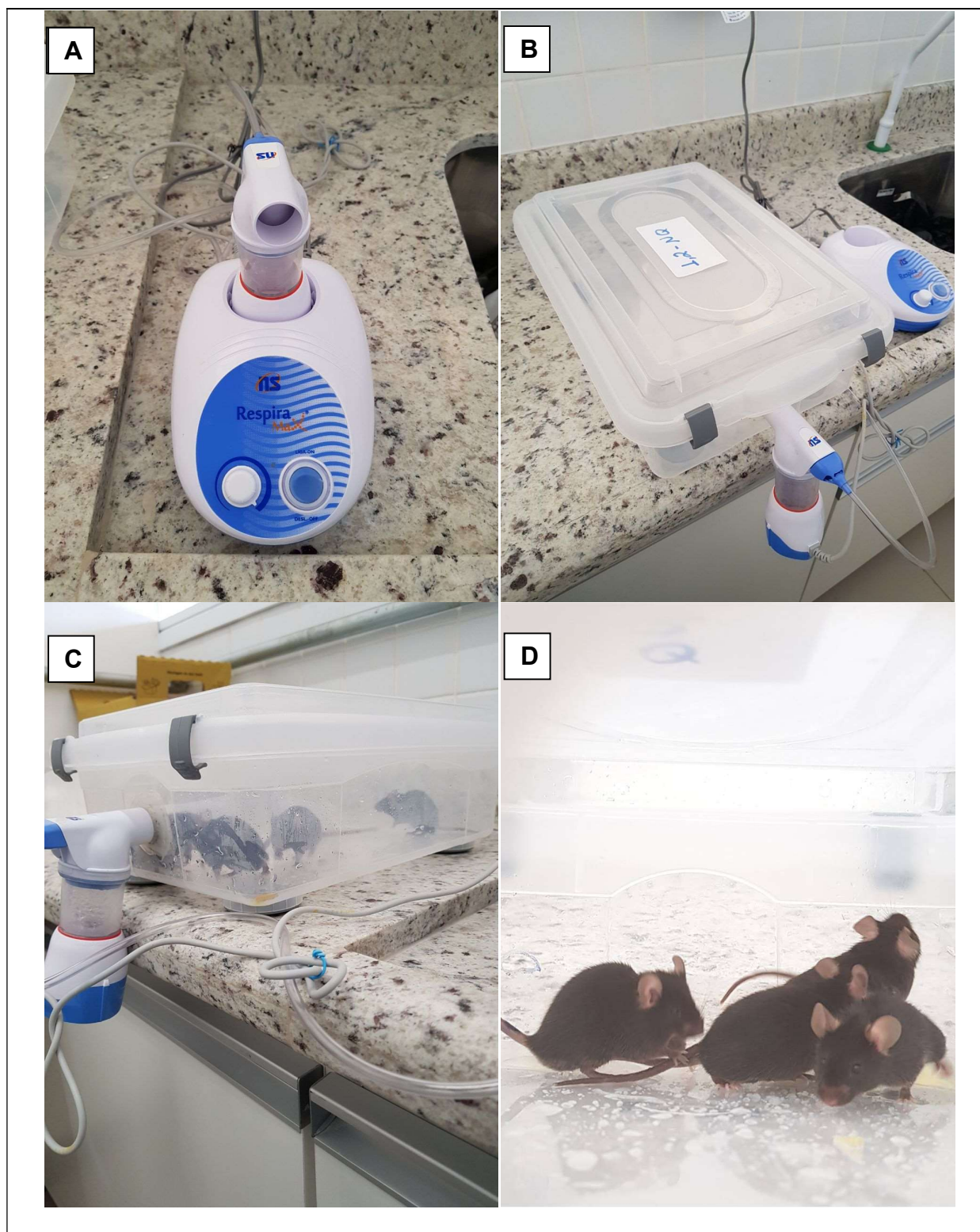


Figura 2. *Exposição dos camundongos ao poluente 1,2-NQ. (A) Conector e nebulizador ultrassônico; (B) Câmara de exposição; (C) Imagem externa da câmara com os animais durante o experimento; (D) Imagem interna da câmara após a nebulização.*

Os animais foram expostos ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ (10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dentro da câmara, considerado como concentração baixa, mimetizando então a exposição na zona urbana) ou ao veículo (0.001 % DMSO, 0.001 % Tween e PBS). O poluente atmosférico foi gerado de uma solução estoque fresca de 1,2-NQ (100 nM, 10 mL) diluída em seu veículo por meio do nebulizador ultrassônico diretamente acoplado à caixa (SANTOS et al., 2014). Os animais foram expostos ao veículo/1,2-NQ sempre às 14 horas, por 15 minutos, 5 vezes por semana, durante 17 semanas.

A vazão do aerosol de dentro da caixa foi determinada em outro estudo realizado no departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo por análise gravimétrica (SANTOS et al., 2014). Em resumo, o copo do nebulizador foi pesado antes e depois de colocar a solução de 1,2-NQ (100 nM; 10 mL), e imediatamente após o processo de nebulização. A massa nebulizada de 1,2-NQ dentro da câmara foi calculada baseada na equação padrão:

$$[mnq = mwnq.[NQ].Vsol]$$

Referente à equação supracitada, os termos significam: mnq = massa de 1,2-NQ nebulizada dentro da câmara; mwnq = peso molecular da 1,2-NQ (158,15 g/mol); [NQ] = concentração da solução do poluente; Vsol = volume da solução do poluente localizado no copo/tubo do nebulizador.

Neste estudo, a concentração resultante de 1,2-NQ nebulizada dentro da câmara foi de aproximadamente 152 ng com 2-3% de perda (SANTOS et al., 2014).

4.2.3 Grupos experimentais

Quanto ao sujeito experimental, foram utilizados 33 animais, sendo eles divididos em 2 grupos de exposição [veículo (n=15, sendo: 5 C57BL/6J, 5 TNFR1KO e 5 TLR4KO) e 1,2-NQ (n=18, sendo: 6 C57BL/6J, 7 TNFR1KO E 5 TLR4KO)] (FIGURA 3).

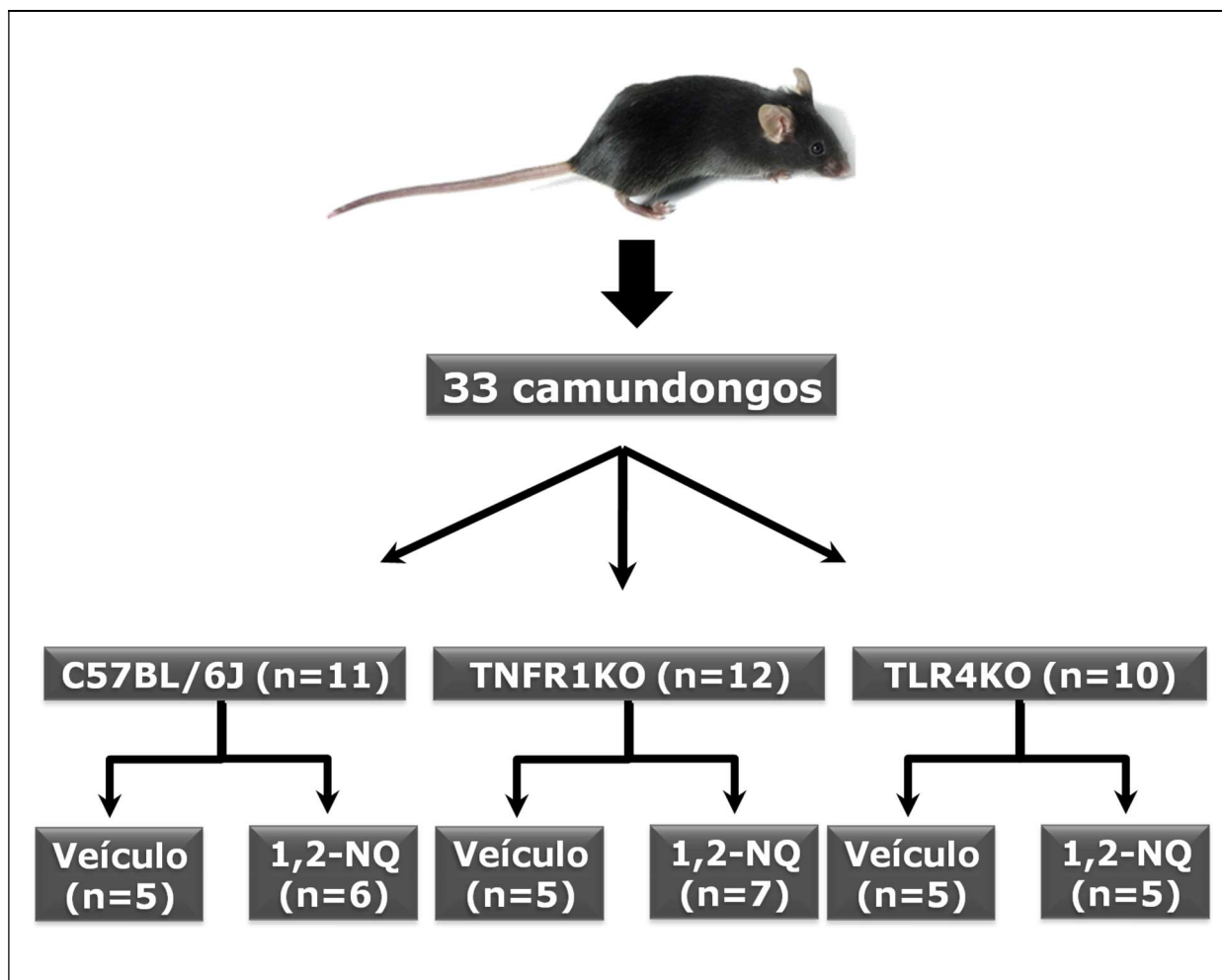


Figura 3. Organização dos grupos e subgrupos experimentais. 33 camundongos divididos em 3 grupos, sendo um grupo selvagem (C57BL/6J) e dois grupos geneticamente modificados (TNFR1KO e TLR4KO). Em cada grupo, houve subdivisão dos animais em 2 subgrupos, ou seja, um subgrupo exposto ao veículo do poluente e outro exposto a 1,2-NQ.

Quanto ao tamanho amostral nos grupos e subgrupos experimentais, foi utilizado o critério de acordo com as diretrizes do CEUA/UNICAMP para se obter o poder do teste de 90% e nível de significância de 0,05. Para a base de cálculos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = 1 + [2C \times (s/d)^2], \text{ sendo:}$$

(C) dependente dos valores escolhidos para o poder do teste; (s) desvio padrão aceitável; (d) diferença esperada entre os grupos. Para o cálculo do C foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C = (z\alpha + z\beta)^2, \text{ sendo:}$$

(z) convenção estatística; (α) chance de considerar dois grupos diferentes erroneamente; (β) chance de encontrar diferença estatística.

Para esta tese, obtivemos então $(C) = (1,96 + 1,282)^2 = 10,51$, considerando o desvio máximo (s) de 20% = 0,2, e a diferença entre os grupos estudados (d) sendo de 50% = 0,5. Com isso, o tamanho amostral ficou $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2/0,5)^2] = 4,36$, arredondado para o mínimo de 5 animais por subgrupo experimental.

4.2.4 Gasto energético

O gasto energético foi determinado pelo consumo de oxigênio (VO_2) e produção de gás carbônico (VCO_2), além da razão de troca respiratória (RER) por meio de calorimetria indireta no equipamento *Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus*, após 6 semanas de exposição a 1,2-NQ. Os animais passaram por adaptação de 24 horas, apenas uma vez, em gaiolas de coleta de dados individuais (29,4 x 29 x 32 cm). Logo, o experimento foi realizado nas 24 horas subsequentes a adaptação e os animais ficaram em gaiolas individuais (FIGURA 4). O gasto energético foi calculado pela equação:

$$\text{Gasto energético (kcal/h)} = (3,85 + (1,232 \times \text{RER})) \times VO_2 \times 1,44.$$



Figura 4. Calorímetro *Oxylet M3 system; PanLab™/Harvard Apparatus*.

4.2.5 Composição corporal

A análise da composição corporal foi realizada após 14 semanas de exposição a 1,2-NQ, pelo equipamento Albira™ Si microPET-CT, padrão ouro, dispondo de módulo de tomografia computadorizada (CT), o qual obteve imagens anatômicas de alta resolução dos camundongos de maneira quantitativa não-invasiva, expressando os resultados em massas magra, gorda e óssea (FIGURA 5). Antes do experimento, os animais foram anestesiados na câmara de isoflurano e colocados na maca do equipamento, que possuía máscara com isoflurano contínuo para manter o animal anestesiado durante o teste. A tomografia teve duração de 35 minutos por animal.

No módulo CT foi utilizado o tubo de raio X com ponto focal nominal de 35 μm , adequado para obtenção de imagens de pequenos animais (SARMENTO, 2016). A tensão no tubo foi ajustada para 35 kV com 400 μA , passando corrente máxima de mA. O detector (*Flat Panel*) foi construído em formato de matriz permitindo subunidades de alta resolução de 50 μm ao longo de grandes áreas. O sensor possuía uma matriz de 2400 x 2400 pixels, que se traduziu em uma área de detecção 2D de 120mm x 120 mm, possibilitando a visualização da imagem total dos camundongos em uma única rotação. A aquisição e o controle de imagem foram realizados por meio do software Albira Suite (SARMENTO, 2016).

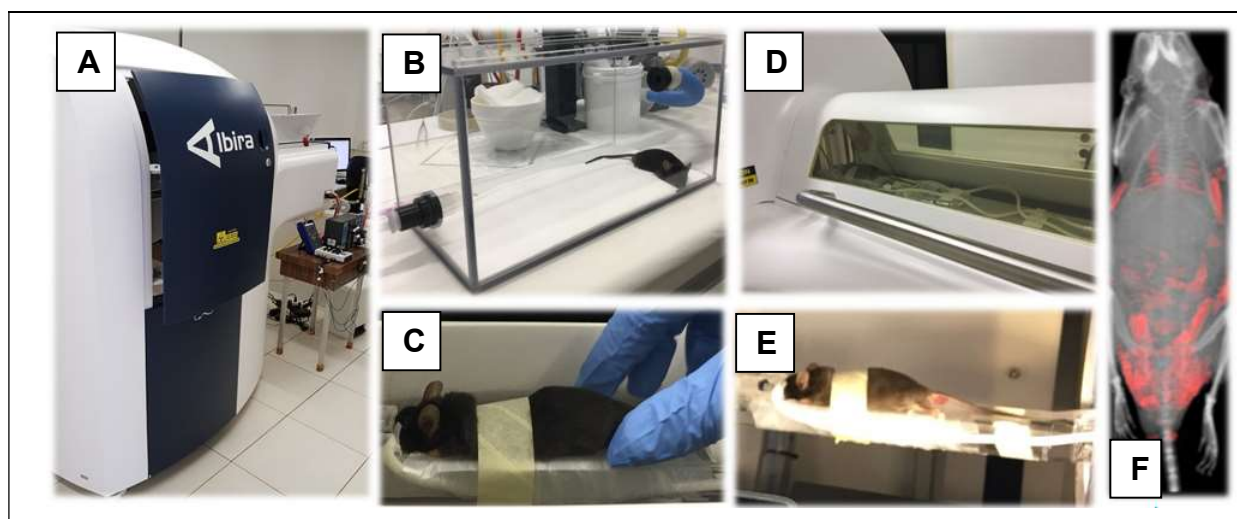


Figura 5. Análise da composição corporal por tomografia computadorizada (CT). (A) Equipamento Albira™ Si Micropet-CT; (B) Camundongo recebendo anestesia na câmara de isoflurano; (C) Adaptação do corpo do animal na maca e na máscara com isoflurano contínuo; (D) Fechamento da tampa do tomógrafo para o início do experimento; (E) Teste sendo realizado com o animal anestesiado e contido; (F) Aquisição da imagem após a avaliação.

4.2.6 Teste de tolerância à insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado em jejum de 6 horas para avaliar a tolerância periférica à insulina nos animais, após 8 semanas de exposição a 1,2-NQ. Foi administrada insulina cristalina (1,5 U/kg, intraperitoneal) e o sangue coletado pela ponta da cauda nos tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

4.2.7 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em jejum de 12 horas para avaliar a tolerância periférica à glicose nos animais, após 9 semanas de exposição a 1,2-NQ. Foi administrada glicose a 20% (1 g x kg⁻¹, intraperitoneal) e o sangue coletado pela ponta da cauda nos tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

4.3 Experimentos pós-eutanásia

4.3.1 Percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal por citometria de fluxo

No final do período de exposição de 17 semanas, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo epididimal foi dissecado e pesado. Para a obtenção de macrófagos do tecido adiposo epididimal, o mesmo foi colocado sobre uma placa de Petri de polipropileno com 10 mL de PBS (pH 7,4). Logo, o excesso de PBS foi removido e o tecido macerado com o auxílio de uma lâmina, sendo colocado no tubo cônico de polipropileno (15 mL) contendo 2 mL de tampão de dissociação do tecido adiposo branco (*WAT dissociation buffer* – 2,5 % HEPES, 10 mg/mL de BSA, 3 mg/mL (0,3 %) de collagenase tipo II em DMEM com 4,5 g/L de glicose sem L-glutamina e piruvato de sódio). Com isso, o tecido foi incubado com collagenase tipo II, em rotações lentas e contínuas, na temperatura de 37° C por 45 minutos. Ao término desse processo, o tecido digerido foi filtrado em um tubo cônico de polipropileno (50 mL) e depois transferido para outro tubo menor de 15 mL com 2 mL de DMEM. Nessa etapa, a suspensão de células foi centrifugada a 300 g, 4° C por 8

minutos. Após a centrifugação, os adipócitos flutuantes e o sobrenadante foram descartados e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de tampão de cloreto de amônio-potássio para lisar os eritrócitos (*ACK buffer*) e 1 mL de meio *eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) para outro processo de centrifugação a 300 g, 4° C por 8 minutos. Finalmente, as células foram ressuspensionadas no tampão de classificação de células ativadas por fluorescência (*FACS buffer* – PBS 1x contendo 2% soro fetal bovino (FBS)) e contadas na câmara de Neubauer (ALLEN et al., 2017). Para o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 foram transferidos o número $\times 10^5$ de macrófagos e as seguintes estratégias de controle e de *gate* realizadas:

Tipo de Controle	Anticorpos e Células	Comprimento de Onda	Fluorescência	Filtro
1- Não marcado	FC Block* + Macrófagos***	-	-	-
2- Com 1 marcação	FC Block* + Macrófagos*** + F4/80 APC (Totais)	640 nm	Vermelha	675/25
3- Com 1 marcação	FC Block* + Macrófagos*** + CD11c PE (M1)	488 nm	Amarela	585/40
4- Com 1 marcação	FC Block* + Macrófagos*** + CD206 FITC (M2)	488 nm	Verde	533/30
5- Com 2 marcações (FMO)**	FC Block* + Macrófagos*** + F4/80 APC + CD11c PE	640 e 488 nm	Vermelha e amarela	675/25 e 585/40
6- Com 2 marcações (FMO)**	FC Block* + Macrófagos*** + F4/80 APC + CD206 FITC	640 e 488 nm	Vermelha e verde	675/25 e 533/30
7- Com 2 marcações (FMO)**	FC Block* + Macrófagos*** + CD11c PE + CD206 FITC	488 e 488 nm	Amarela e verde	585/40 e 533/30
8- Amostras com as 3 marcações	FC Block* + Macrófagos*** + F4/80 APC + CD11c PE + CD206 FITC	640, 488 e 488 nm	Vermelha, amarela e verde	675/25, 585/40 e 533/30

Tabela 1. Estratégia de controle e de *gate* no citômetro de fluxo para a análise do número total de macrófagos (F4/80), M1 (CD11c) e M2 (CD206) provenientes do tecido adiposo branco epididimal. * O FC Block evitou a ligação dos marcadores de macrófagos no CD16 e CD32. ** Foi utilizado o método fluorescência menos 1 (FMO) com o objetivo de fazer a compensação dos fluoróforos e o ajuste de fluorescência de cada filtro. *** Quanto aos parâmetros para aquisição de células do citômetro, 5000 eventos foram determinados dentro do *gate* F4/80 positivo.

4.4 Análise estatística

Com o propósito de reduzir o risco da média dos resultados poderem variar de acordo com a amostra, foi utilizado o erro padrão como medida de variação da média amostral em relação à média da população de camundongos, dividindo o desvio padrão pela raiz quadrada do número de observações da amostra. Com isso, os resultados referentes ao efeito da solução veículo/1,2-NQ nos animais C57BL/6J e *knockouts* foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de valores absolutos ou porcentagem.

Para a análise dos gráficos de barras referente aos camundongos C57BL/6J, foi utilizado o teste t *Student* não-pareado bicaudal. Quando os animais geneticamente modificados TNFR1 e TLR4 foram inseridos nos gráficos de barras, o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey foram executados. Quanto aos gráficos de linhas, os dados foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Após os gráficos de linhas, foi realizado o cálculo da área sob a curva, expresso em gráfico de barras. As diferenças entre as médias foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (GraphPad Prism 5.0®). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas de acordo com a recomendação do *software* para cada caso.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a massa corporal em camundongos C57BL/6J

Há redução significativa na massa corporal dos camundongos C57BL/6J expostos ao poluente 1,2-NQ em relação ao veículo, apenas na décima quinta semana (FIGURA 6A). O cálculo da área sob a curva não evidenciou diferença estatística entre os dois grupos (FIGURA 6B).

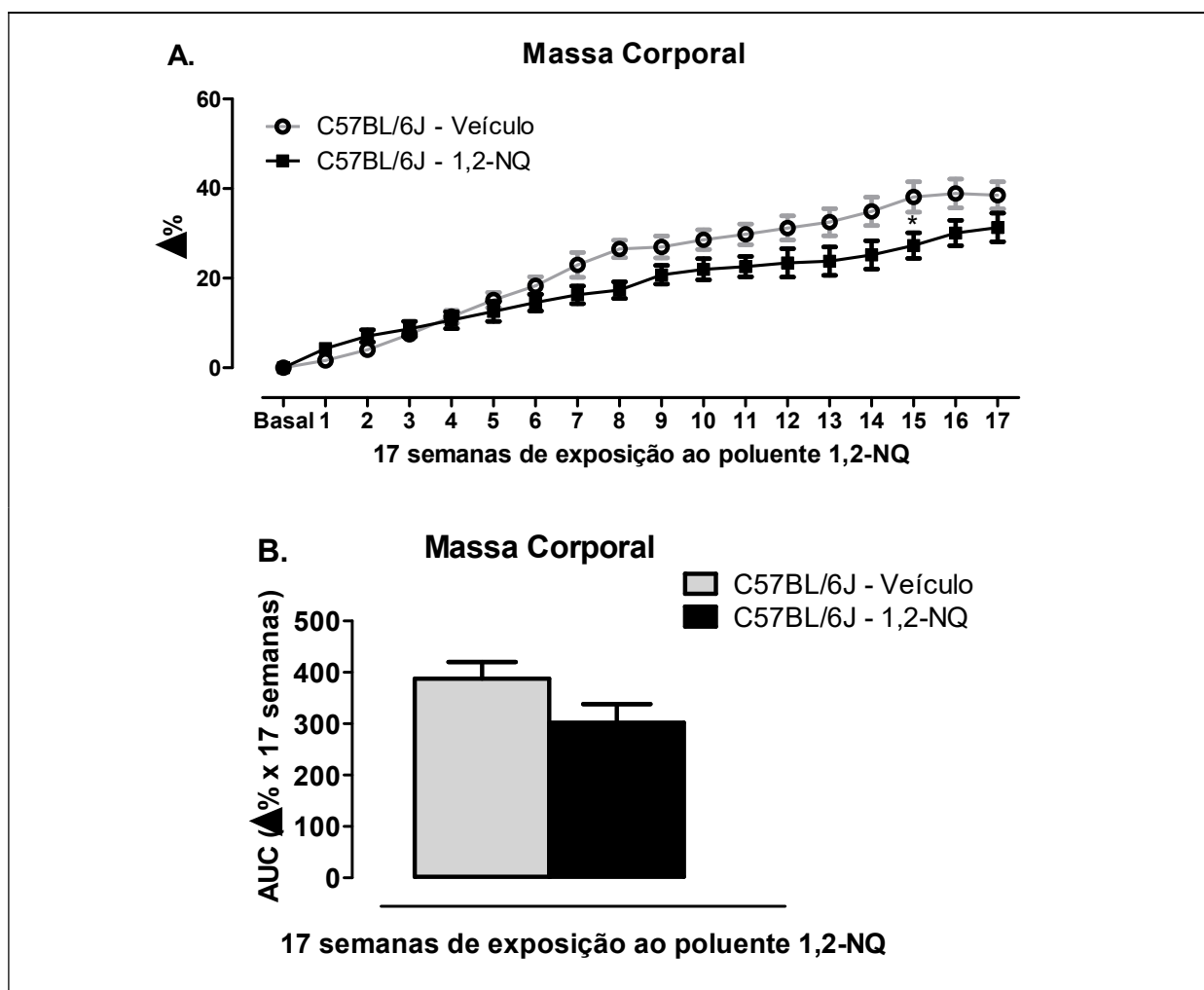


Figura 6. Massa corporal cumulativa dos camundongos C57BL/6J. 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Delta referente à evolução da massa corporal; (B) Área sob a curva; (A-B) Média $\pm$ EPM, $n = 5$ (veículo) e $n = 6$ (1,2-NQ); (A) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$; (B) Teste t não pareado bicaudal, $*p < 0,05$.

5.2 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a ingestão alimentar em camundongos C57BL/6J

A ingestão alimentar do grupo exposto ao veículo do poluente foi maior da sétima até a décima semana de exposição comparada ao grupo exposto a 1,2-NQ (FIGURA 7A). Além disso, no cálculo da área sob a curva foi encontrada redução estatisticamente significativa no grupo exposto ao poluente comparado ao veículo (FIGURA 7B).

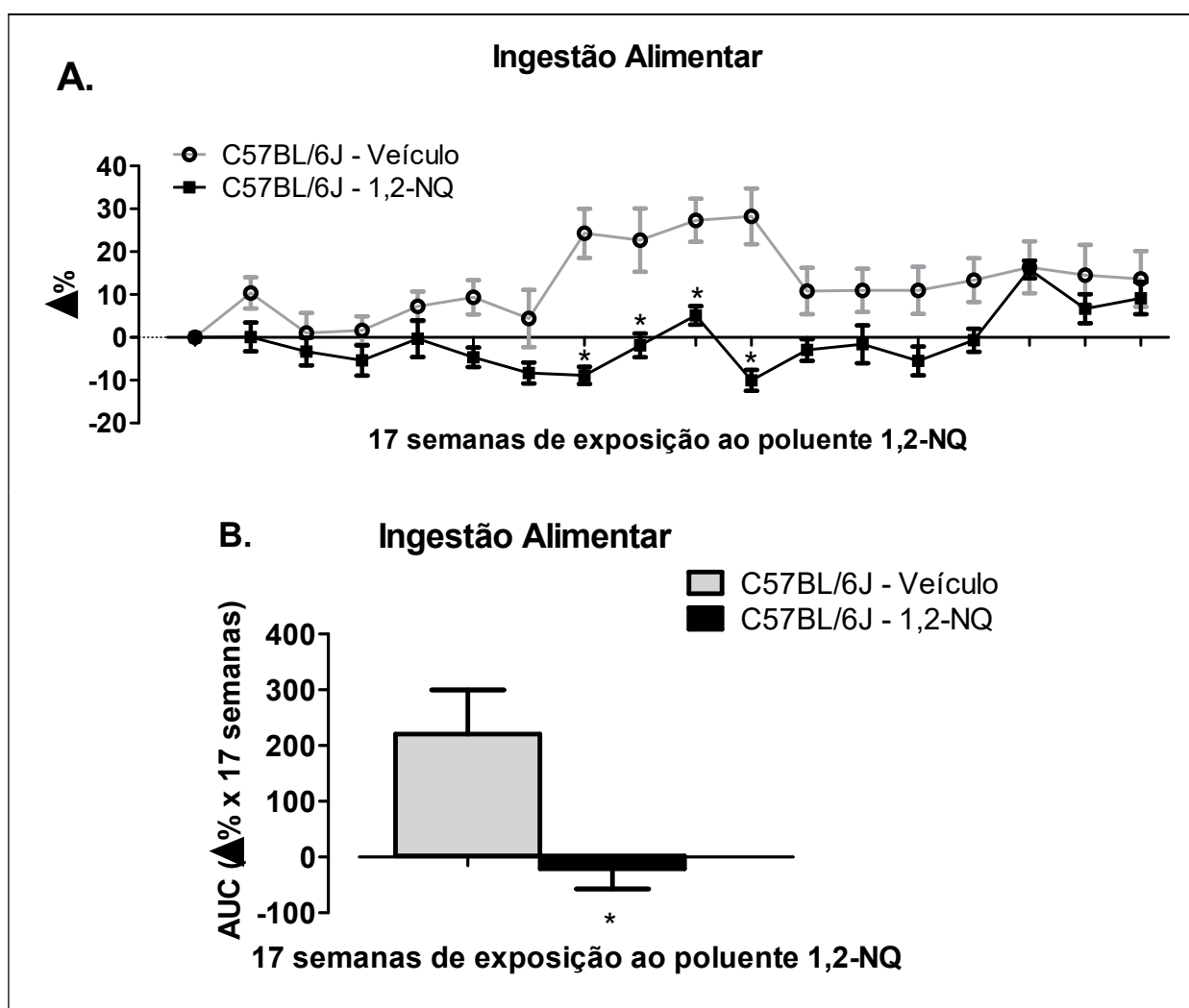


Figura 7. Ingestão alimentar cumulativa dos camundongos C57BL/6J. 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Delta referente à evolução da ingestão alimentar; (B) Área sob a curva; (A-B) Média $\pm$ EPM, n= 5 (veículo) e n= 6 (1,2-NQ); (A) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, *p<0,05; (B) Teste t não pareado bicaudal, *p<0,05.

5.3 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o gasto energético em camundongos C57BL/6J

Na sexta semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste referente ao gasto energético foi realizado e foram observados aumentos noturnos estatisticamente significantes do consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e *heat* nos animais selvagens expostos a 1,2-NQ (FIGURAS 8A, 8B e 8D). No RER não houve diferença estatisticamente significativa (FIGURA 8C).

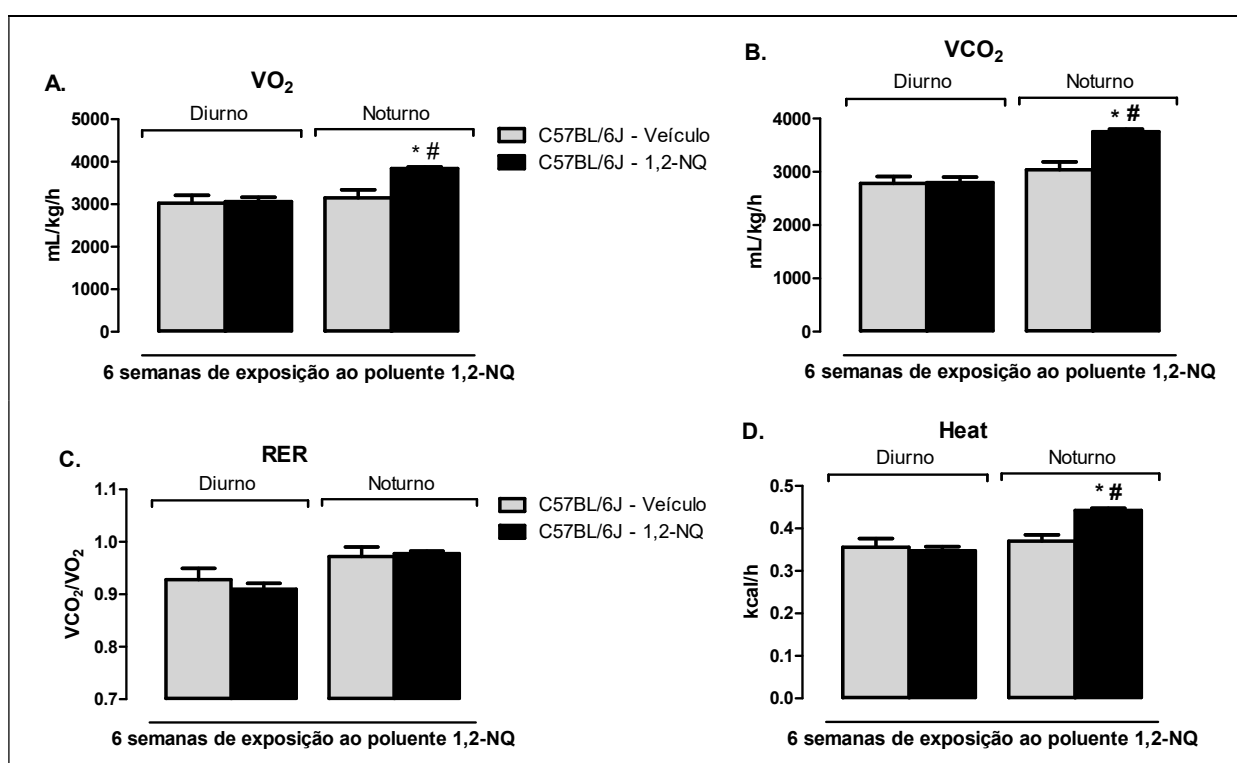


Figura 8. Gasto energético dos camundongos C57BL/6J. 6 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Consumo de oxigênio; (B) Produção de gás carbônico; (C) Razão de troca respiratória; (D) *Heat*; (A-D) Média $\pm$ EPM, n= 5 (expostos ao veículo do poluente), n= 4 (expostos a 1,2-NQ). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, *p<0,05 (comparação entre grupos 1,2-NQ e veículo no mesmo período do dia) e #p<0,05 (comparação entre grupos submetidos ao mesmo tipo de exposição em períodos diferentes).

5.4 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o ITT em camundongos C57BL/6J

Na oitava semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado e nos tempos 05 e 10 minutos houve maior tolerância ao hormônio, com redução da glicemia nos animais selvagens expostos a 1,2-NQ (FIGURA 9A). Por outro lado, no cálculo da área sob a curva não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (FIGURA 9B).

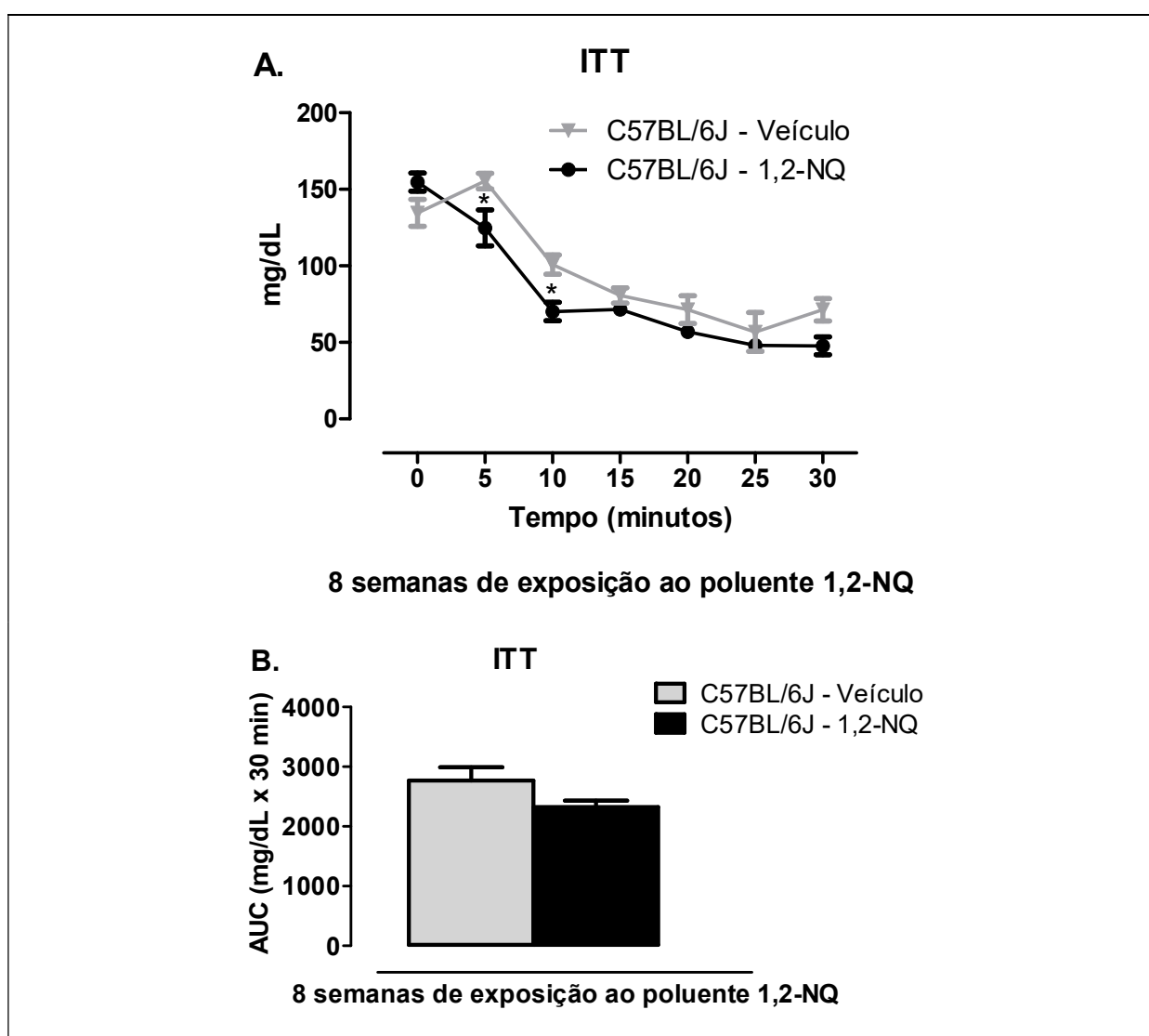


Figura 9. Teste de tolerância à insulina (ITT) dos camundongos C57BL/6J. 8 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Gráfico da curva glicêmica nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos; (B) Área sob a curva. Média $\pm$ EPM, $n= 5$ (veículo) e $n= 6$ (1,2-NQ); (A) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p<0,05$; (B) Teste t não pareado bicaudal, $*p<0,05$.

5.5 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o GTT em camundongos C57BL/6J

Na nona semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado e após 120 minutos da injeção intraperitoneal de glicose a 20% ($1 \text{ g} \times \text{kg}^{-1}$), houve aumento da glicemia nos animais selvagens expostos a 1,2-NQ comparada ao veículo (FIGURA 10A). A área sob a curva calculada do GTT foi maior no grupo 1,2-NQ comparada à área do grupo veículo. Observou-se também glicemia de jejum maior no grupo 1,2-NQ comparada ao grupo veículo (FIGURAS 10B e 10C).

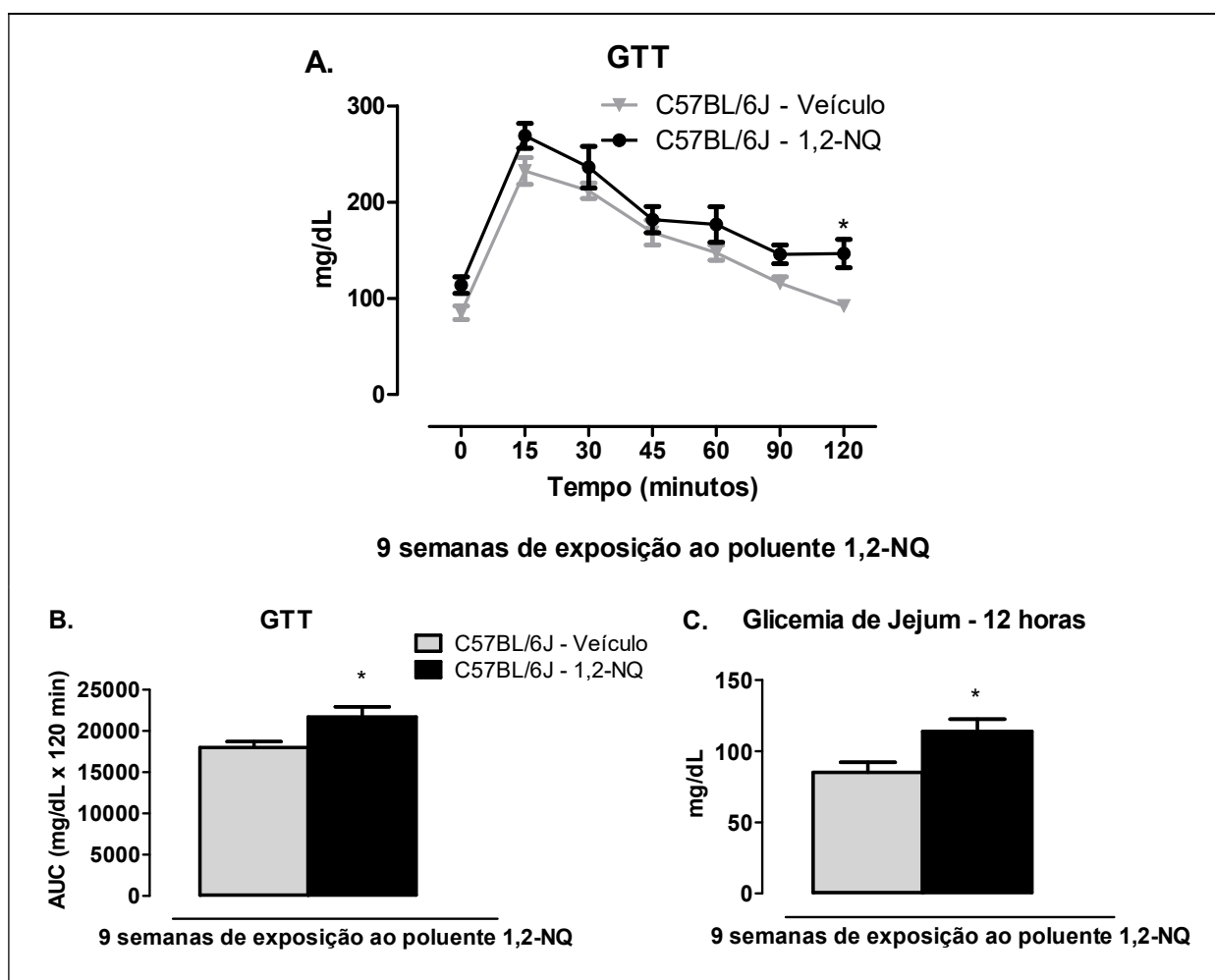


Figura 10. Teste de tolerância à glicose (GTT) e glicemia de jejum dos camundongos C57BL/6J. 9 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Gráfico da curva glicêmica nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos; (B) Área sob a curva; (C) Glicemia após 12 horas de jejum. Média $\pm$ EPM, $n=5$ (veículo) e $n=6$ (1,2-NQ); (A) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p<0,05$; (B e C) Teste t não pareado bicaudal, $*p<0,05$.

5.6 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a composição corporal em camundongos C57BL/6J

Na décima quarta semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste de composição corporal realizado por tomografia computadorizada (CT) pelo equipamento Albira™ Si microPET-CT, padrão ouro, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa nas massas gorda, magra e óssea nos animais expostos ao poluente químico atmosférico em relação ao veículo (FIGURA 11).

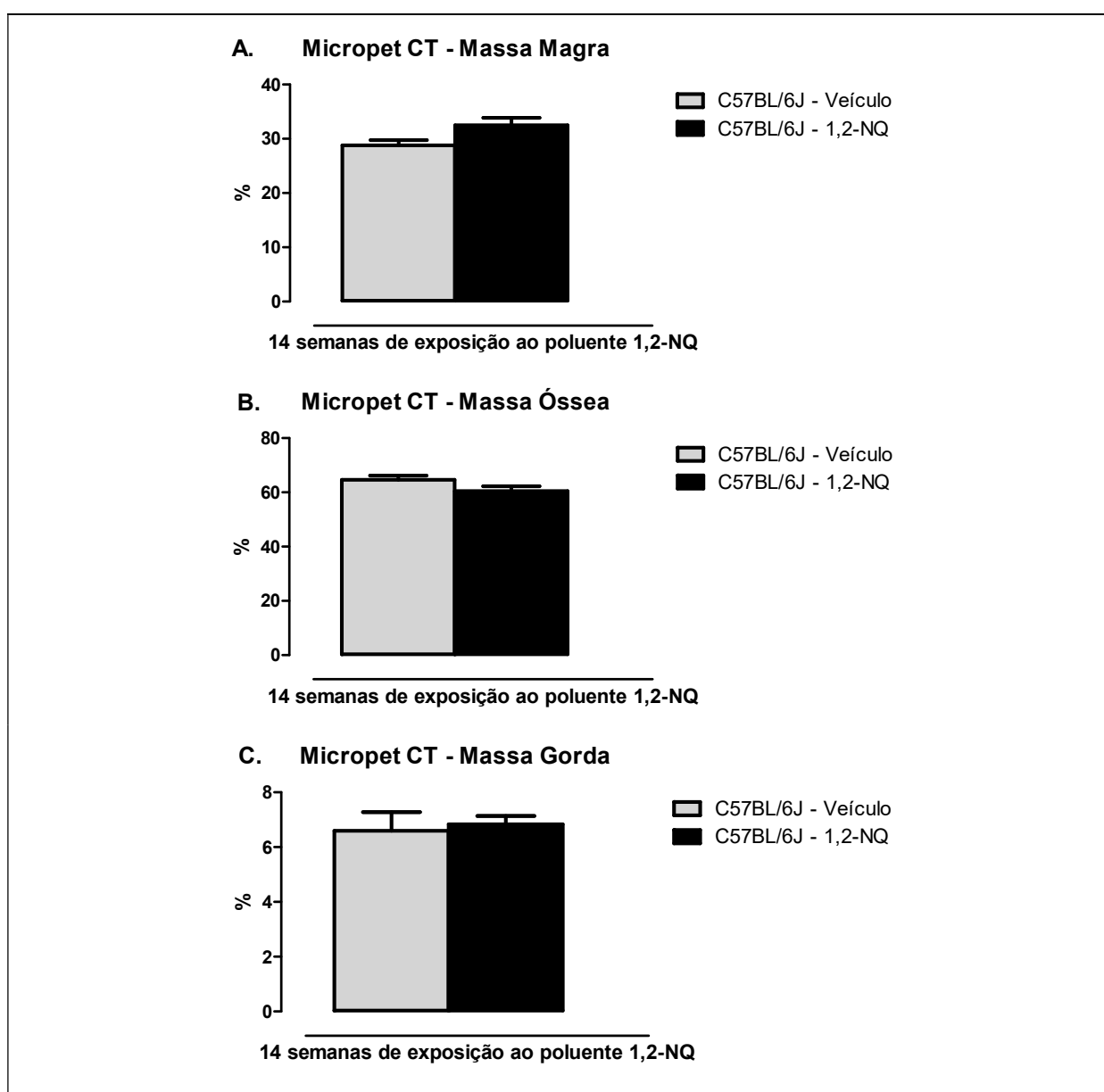


Figura 11. Composição corporal por tomografia computadorizada de alta resolução MicroPet-CT. 14 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Massa magra; (B) Massa óssea; (C) Massa gorda. Média $\pm$ EPM, $n = 5$ (veículo) e $n = 6$ (1,2-NQ); (A-C) Teste t não pareado bicaudal, $*p < 0,05$.

5.7 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal em camundongos C57BL/6J

Cinco dias após a décima sétima semana de exposição a 1,2-NQ ou ao veículo do poluente, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo branco epididimal foi dissecado e pesado. Conforme esperado, devido à tomografia computadorizada (CT) prévia, realizada na décima quarta semana (FIGURA 11C), os animais expostos a 1,2-NQ não tiveram alteração estatisticamente significativa na massa adiposa (FIGURA 12A). Nesse sentido, o percentual de macrófagos totais marcados com F4/80 também não teve alteração no grupo exposto ao poluente em relação ao veículo (FIGURA 12B). Por outro lado, embora a exposição ao poluente químico atmosférico não tenha alterado a massa adiposa branca e o percentual de macrófagos totais, os animais selvagens tiveram aumento no percentual de macrófagos pró-inflamatórios M1 marcados com CD11c (FIGURA 12C) e redução ($p=0,057$) nos antiinflamatórios M2 marcados com CD206 (FIGURA 12D).

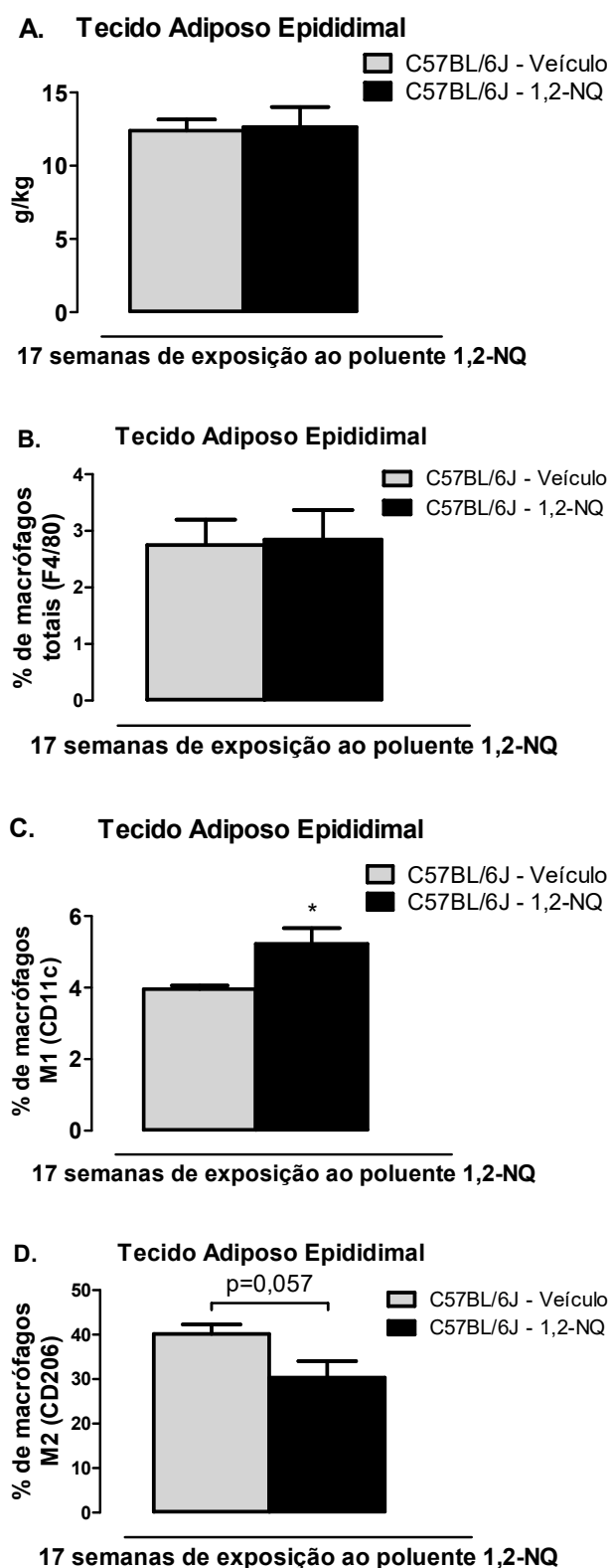


Figura 12. Perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal. 5 dias após 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Massa do tecido adiposo epididimal; (B) % de macrófagos totais marcados com F4/80; (C) % de macrófagos M1 marcados com CD11c; (D) % de macrófagos M2 marcados com CD206. Média $\pm$ EPM, $n = 5$ (veículo) e $n = 6$ (1,2-NQ); (A-D) Teste t não pareado bicaudal, * $p < 0,05$.

5.8 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a massa corporal em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Como mostrado anteriormente na Figura 6B, há redução significativa na massa corporal dos camundongos C57BL/6J expostos ao poluente 1,2-NQ em relação ao veículo, apenas na décima quinta semana (FIGURA 13A).

Os animais TNFR1KO expostos a 1,2-NQ apresentaram semelhante padrão de resultado em comparação ao grupo veículo, entretanto, não foi observada diferença estatística em nenhuma das semanas estudadas (FIGURA 13B), provavelmente devido à grande dispersão dos dados.

Os camundongos TLR4KO expostos a 1,2-NQ não apresentaram diferença de massa corporal na maior parte das semanas estudadas, exceto na décima semana onde se observou redução significativa da massa corporal nos animais TLR4KO expostos a 1,2-NQ comparada ao grupo veículo (FIGURA 13C). No cálculo da área sob a curva não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (FIGURA 13D).

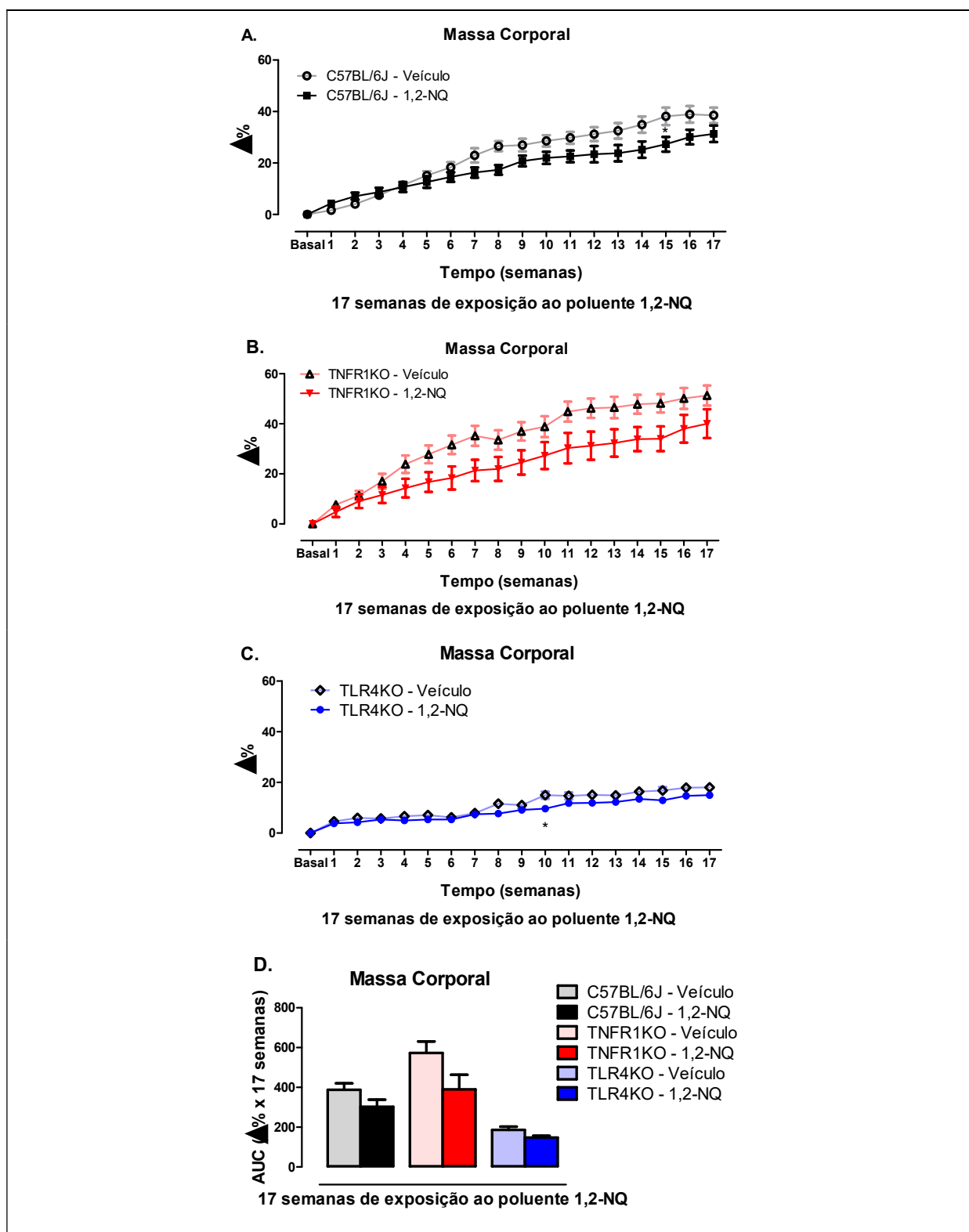


Figura 13. Massa corporal cumulativa dos camundongos geneticamente modificados. 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A-C) Delta referente à evolução da massa corporal dos animais selvagens (C57BL/6J) e geneticamente modificados (TNFR1KO e TLR4KO); (D) Área sob a curva; (A-D) Média $\pm$ EPM [C57BL/6J, n= 5 (veículo) e 6 (1,2-NQ); TNFR1KO, n= 5 (veículo) e 7 (1,2-NQ); TLR4KO, n= 5 (veículo) e 5 (1,2-NQ)]; (A-C) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$; (D) ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

5.9 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a ingestão alimentar em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Como mencionado na Figura 7B, a ingestão alimentar da sétima até a décima semanas de exposição foi menor nos camundongos C57BL/6J expostos a 1,2-NQ (FIGURA 14A).

Os animais TNFR1KO expostos a 1,2-NQ não apresentaram redução da ingestão alimentar em comparação ao grupo exposto ao veículo (FIGURA 14B), conforme ocorreu nos camundongos selvagens. Por outro lado, os TLR4KO expostos a 1,2-NQ apresentaram maior ingestão alimentar observada desde a primeira até a sexta semanas e da décima primeira até a décima sétima semanas (FIGURA 14C). No cálculo da área sob a curva houve aumento da ingestão nos camundongos TLR4KO expostos a 1,2-NQ em relação ao veículo do poluente e redução da ingestão nos TLR4 expostos ao veículo em relação aos animais selvagens com exposição correspondente (FIGURA 14D).

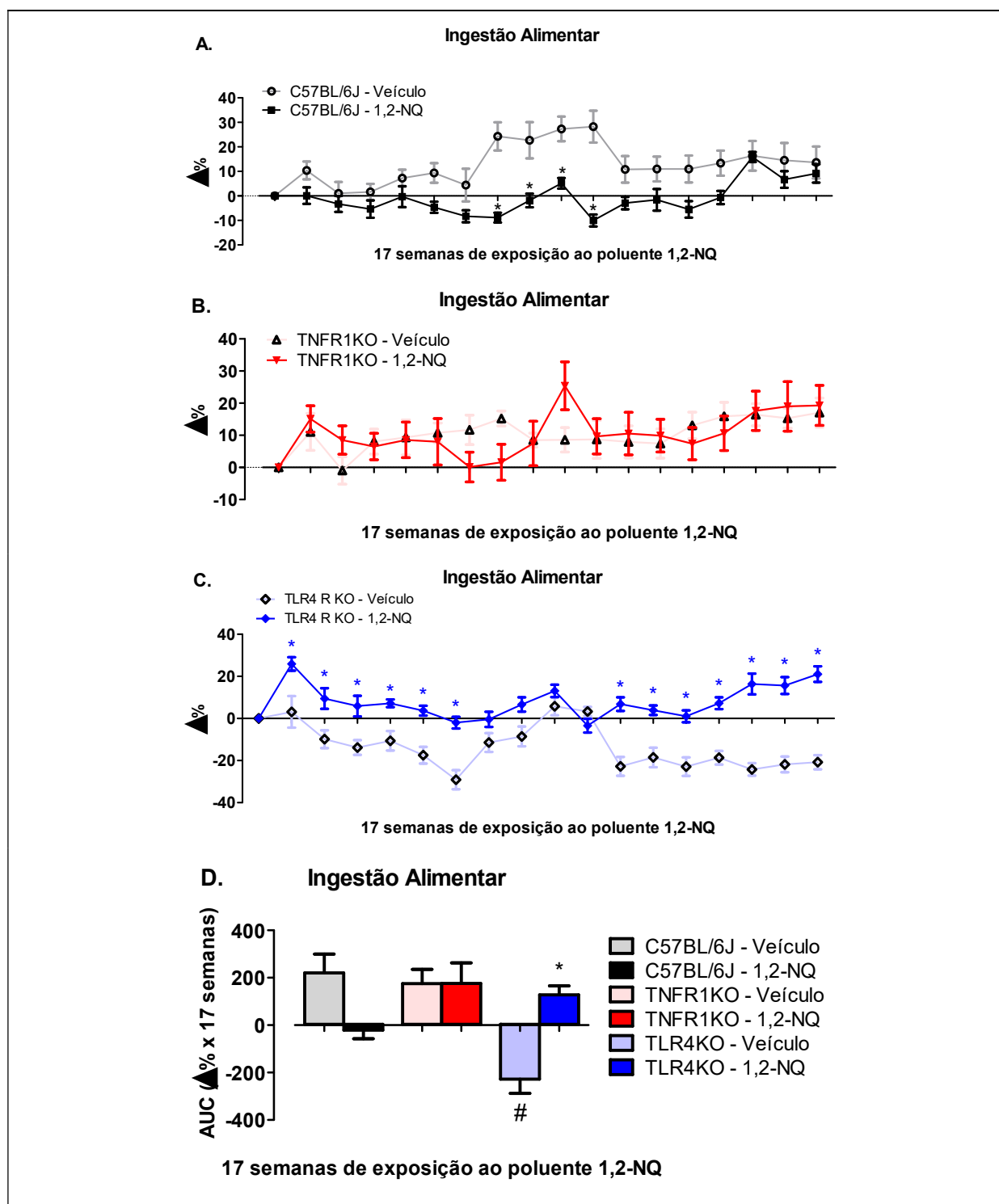


Figura 14. *Ingestão alimentar cumulativa dos camundongos geneticamente modificados.* 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A-C) Delta referente à evolução da massa corporal dos animais selvagens (C57BL/6J) e geneticamente modificados (TNFR1KO e TLR4KO); (D) Área sob a curva; (A-D) Média $\pm$ EPM [C57BL/6J, n= 5 (veículo) e 6 (1,2-NQ); TNFR1KO, n= 5 (veículo) e 7 (1,2-NQ); TLR4KO, n= 5 (veículo) e 5 (1,2-NQ)]; (A-C) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$; (D) ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ (comparação entre grupos da mesma linhagem) e # $p < 0,05$ (comparação entre TNFR1KO/TLR4KO e C57BL/6J submetidos ao mesmo tratamento).

5.10 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o gasto energético em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Na sexta semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste referente ao gasto energético foi realizado e foram observados aumentos noturnos estatisticamente significantes do consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e nos animais expostos ao poluente quando comparados aos seus respectivos controles expostos ao veículo (FIGURAS 15A, 15B e 15D). Somente os animais TNFR1KO expostos a 1,2-NQ não apresentaram aumento no *heat* noturno, porém aumentaram o consumo de oxigênio e produção de gás carbônico em relação ao veículo também no período diurno quando comparado ao seu respectivo controle da mesma linhagem (FIGURAS 15A e 15B). No RER não houve diferença estatisticamente significativa em todas as linhagens estudadas (FIGURA 15C).

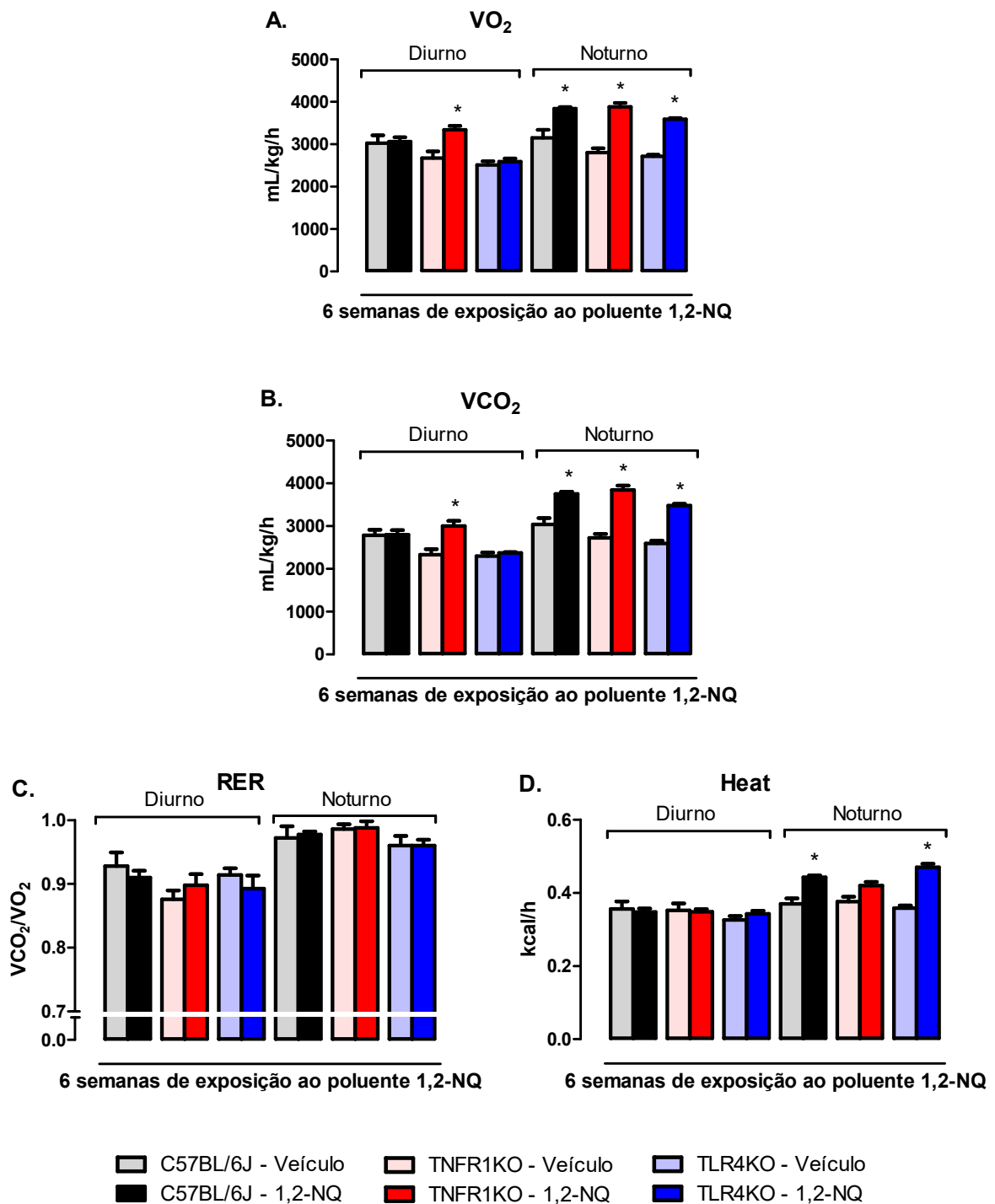


Figura 15. Gasto energético dos camundongos geneticamente modificados. 6 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Consumo de oxigênio; (B) Produção de gás carbônico; (C) Razão de troca respiratória; (D) *Heat*; (A-D) Média $\pm$ EPM, $n = 5$ (C57BL/6J, TNFR1KO E TLR4KO expostos ao veículo do poluente e TNFR1KO exposto a 1,2-NQ), $n = 4$ (C57BL/6J e TLR4KO expostos a 1,2-NQ). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (comparação entre grupos da mesma linhagem).

5.11 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o ITT em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Como mencionado na Figura 9A, na oitava semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, houve maior tolerância à insulina evidenciada pelo ITT no grupo exposto a 1,2-NQ em comparação ao veículo nos animais selvagens, com redução da glicemia em resposta à insulina apenas aos 5 e 10 minutos (FIGURA 16A). Similar resposta foi apresentada pelos camundongos TNFR1KO expostos ao poluente 1,2-NQ em comparação ao seu respectivo veículo, havendo somente redução da glicemia em resposta à insulina aos 10 e 30 minutos do teste (FIGURA 16B). Em contrapartida, os camundongos TLR4KO expostos ao poluente 1,2-NQ apresentaram maior tolerância à insulina, com redução da glicemia em resposta à insulina durante a maior parte do teste (FIGURA 16C). A área sob a curva do ITT demonstra que somente o grupo TLR4KO exposto a 1,2-NQ apresentou maior tolerância à insulina quando comparado ao veículo da mesma linhagem (FIGURA 16D). É importante ressaltar que a glicemia de jejum dos animais TNFR1KO e dos animais TLR4KO expostos a 1,2-NQ foi maior do que seus respectivos controles expostos ao veículo (FIGURAS 16B e 16C).

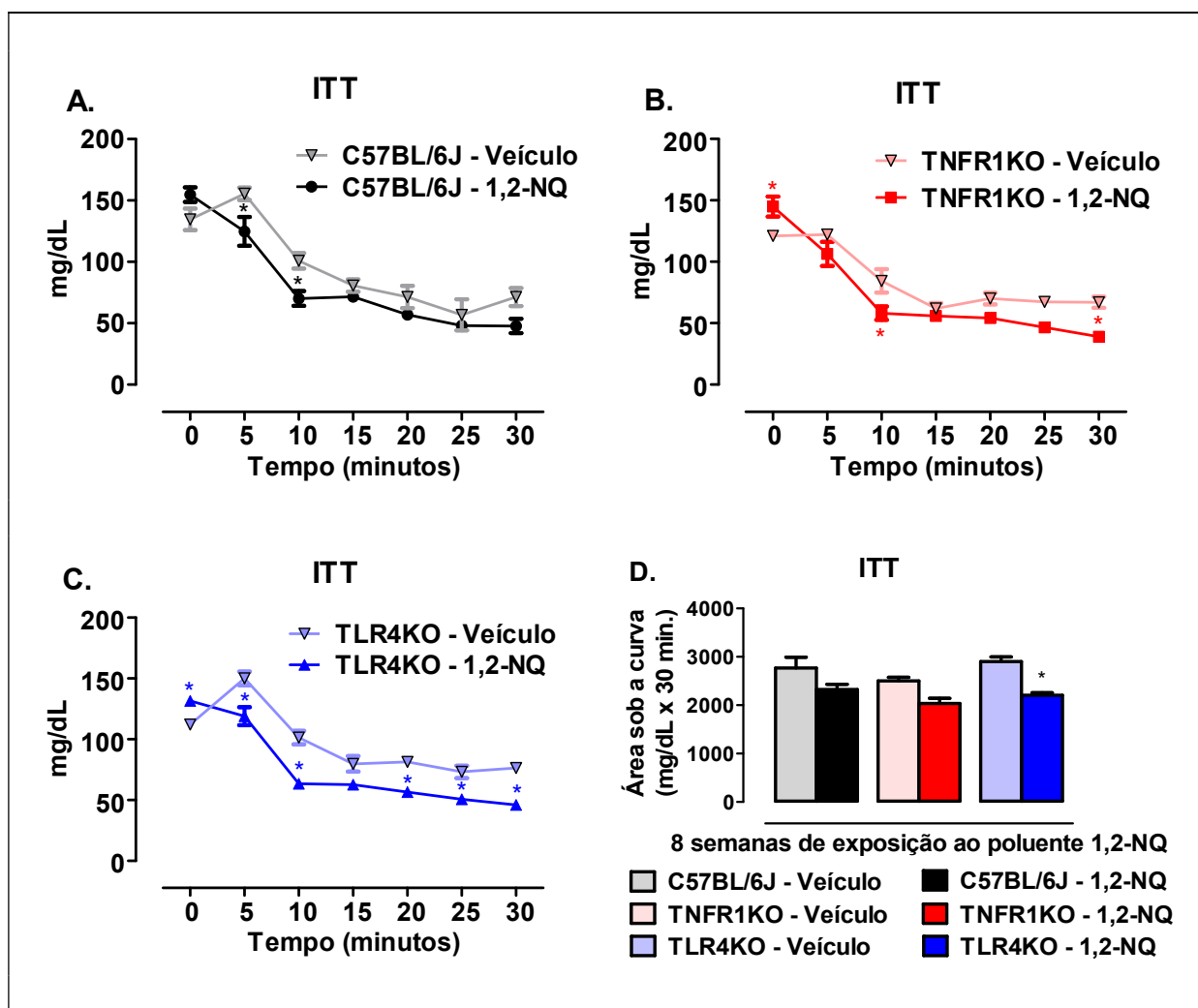


Figura 16. Teste de tolerância à insulina (ITT) dos camundongos geneticamente modificados. 8 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) C57BL/6J, n= 5 (veículo) e 6 (1,2-NQ); (B) TNFR1KO, n= 5 (veículo) e 7 (1,2-NQ); (C) TLR4KO, n= 5 (veículo) e 5 (1,2-NQ); (D) Área sob a curva; (A-C) Média $\pm$ EPM, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; (D) Média $\pm$ EPM, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey; (A-D) * $p < 0,05$ (comparação entre grupos da mesma linhagem).

5.12 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o GTT em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Na nona semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado e após 120 minutos da injeção intraperitoneal de glicose ($1 \text{ g} \times \text{kg}^{-1}$), os animais selvagens expostos a 1,2-NQ apresentaram a glicemia mais alta no último tempo (120 minutos) do que o grupo veículo (FIGURA 17A).

Não houve diferença estatística na curva de GTT dos animais TNFR1KO e TLR4KO expostos ao poluente 1,2-NQ e seus respectivos controles das mesmas linhagens (FIGURAS 17B e 17C).

O cálculo da área sob a curva demonstrou que os camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ foram intolerantes à glicose quando comparados aos seus controles expostos ao veículo. De forma oposta, animais TNFR1KO e TLR4KO expostos ao poluente 1,2-NQ não apresentaram intolerância a glicose (FIGURA 17D) ou aumento na glicemia de jejum (FIGURAS 17E). Nesse sentido, os camundongos TNFR1KO foram menos afetados pela exposição a 1,2-NQ por mostrarem tanto no cálculo da área sob a curva quanto na glicemia de jejum diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais C57BL/6J também expostos ao poluente (FIGURAS 17D E 17E).

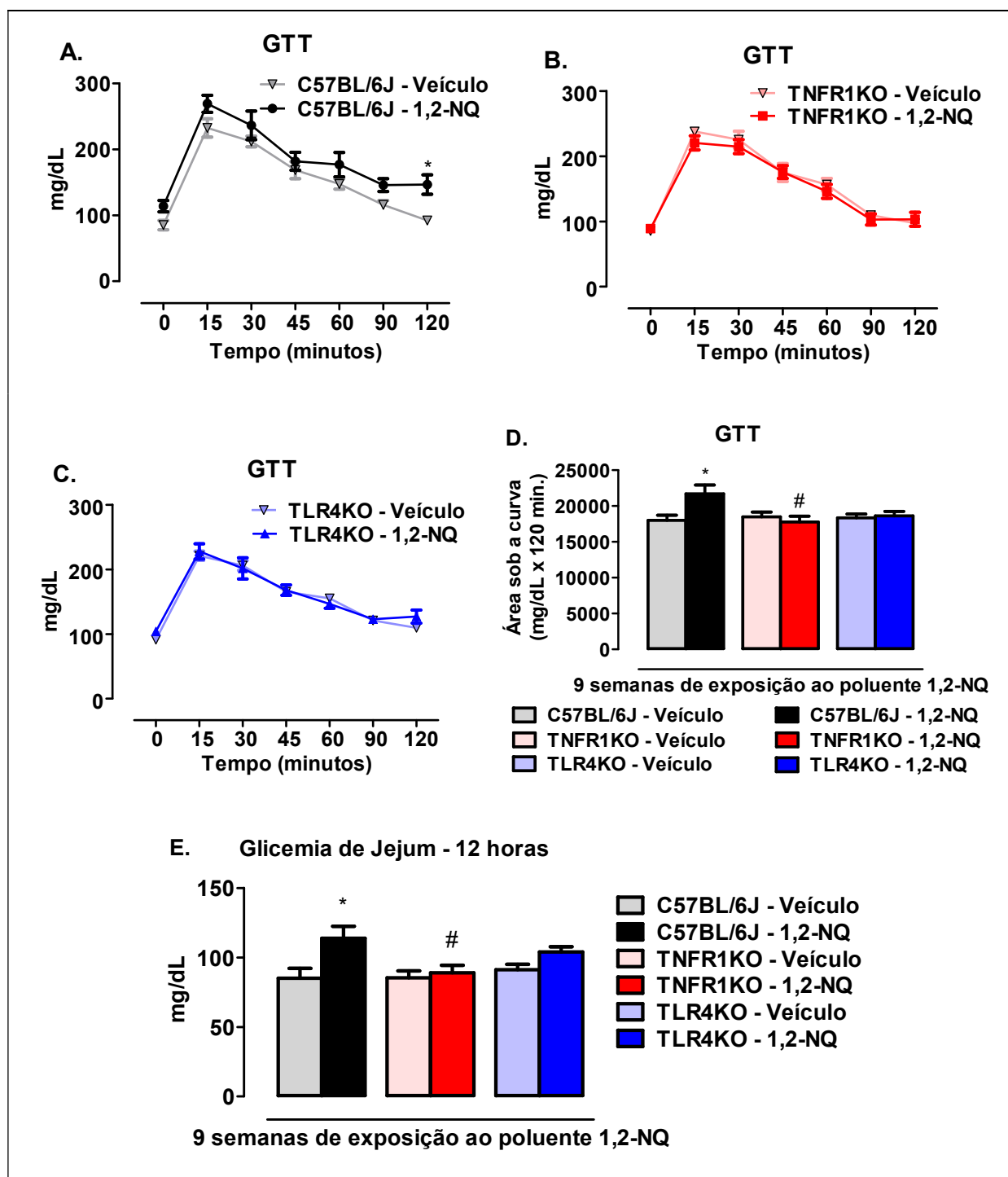


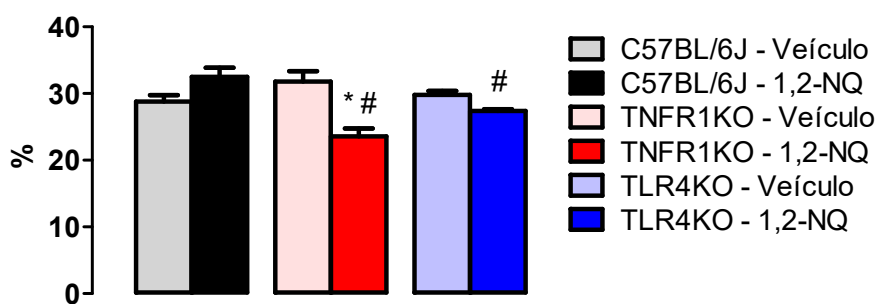
Figura 17. Teste de tolerância à glicose (GTT) dos camundongos geneticamente modificados. 9 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) C57BL/6J, n= 5 (veículo) e 6 (1,2-NQ); (B) TNFR1KO, n= 5 (veículo) e 7 (1,2-NQ); (C) TLR4KO, n= 5 (veículo) e 5 (1,2-NQ); (D) Área sob a curva; (E) Glicemia após jejum de 12 horas (A-C) Média $\pm$ EPM, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; (D-E) Média $\pm$ EPM, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey; (A-E) * $p < 0,05$ (comparação entre grupos da mesma linhagem) e # $p < 0,05$ (comparação entre TNFR1KO/TLR4KO e C57BL/6J submetidos ao mesmo tratamento).

5.13 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre a composição corporal em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Na décima quarta semana de exposição ao poluente 1,2-NQ ou veículo, o teste de composição corporal realizado por tomografia computadorizada (CT) pelo equipamento Albira™ Si microPET-CT. Não houve diferença estatisticamente significativa nas massas gorda, magra e óssea nos animais selvagens expostos ao poluente químico atmosférico em relação ao veículo (FIGURAS 18A, 18B e 18C).

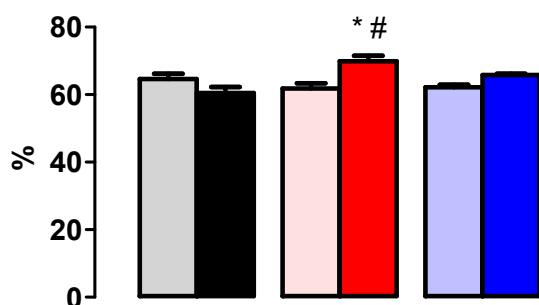
Ao contrário do ocorrido com os camundongos selvagens, a exposição a 1,2-NQ modulou a composição corporal dos animais TNFR1KO que apresentaram redução na massa magra e aumento na massa óssea (FIGURAS 18A E 18B). Na comparação entre os camundongos TNFR1KO e TLR4KO *versus* C57BL/6J houve redução na massa magra dos TNFR1KO e TLR4KO e aumento na massa óssea dos TNFR1KO expostos ao poluente (FIGURAS 18A E 18B). A massa gorda não foi alterada pela exposição ao poluente químico atmosférico em nenhuma linhagem estudada (FIGURA 18C).

A. Micropet CT - Massa Magra



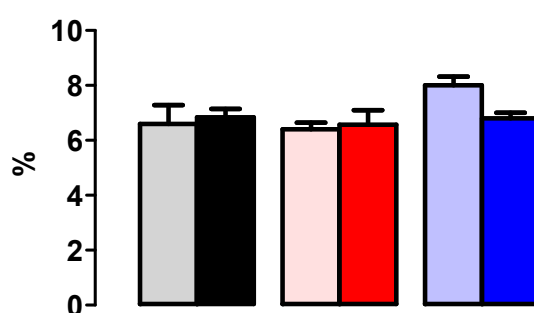
14 semanas de exposição ao poluente 1,2-NQ

B. Micropet CT - Massa Óssea



14 semanas de exposição ao poluente 1,2-NQ

C. Micropet CT - Massa Gorda



14 semanas de exposição ao poluente 1,2-NQ

Figura 18. Composição corporal por tomografia computadorizada de alta resolução MicroPet-CT dos camundongos geneticamente modificados. 14 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Percentual de massa magra; (B) Percentual de massa óssea; (C) Percentual de massa gorda; (A-C) Média $\pm$ EPM, n= 5 (C57BL/6J, TNFR1KO, TLR4KO expostos ao veículo do poluente e TLR4KO exposto a 1,2-NQ), n= 6 (C57BL/6J exposto a 1,2-NQ) e n=7 (TNFR1KO exposto a 1,2-NQ). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, *p<0,05 (comparação entre grupos da mesma linhagem) e #p<0,05 (comparação entre TNFR1KO/TLR4KO e C57BL/6J submetidos ao mesmo tratamento).

5.14 Efeitos da exposição subcrônica a 1,2-NQ sobre o percentual de macrófagos totais, M1 pró-inflamatórios e M2 antiinflamatórios no tecido adiposo branco epididimal em camundongos *knockouts* para TNFR1 e TLR4

Cinco dias após a décima sétima semana de exposição a 1,2-NQ ou ao veículo do poluente, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo branco epididimal foi dissecado e pesado. Conforme esperado, devido à tomografia computadorizada (CT) prévia, realizada na décima quarta semana (FIGURA 18C), os animais de todas as linhagens expostos a 1,2-NQ não tiveram alteração estatisticamente significativa na massa adiposa epididimal (FIGURA 19A). Nesse sentido, o percentual de macrófagos totais marcados com F4/80 também não teve alteração estatisticamente significativa no grupo exposto ao poluente (FIGURA 19B).

Por outro lado, embora a exposição ao poluente químico atmosférico não tenha alterado a massa adiposa branca e o percentual de macrófagos totais das três linhagens estudadas, os animais selvagens expostos a 1,2-NQ tiveram aumento no percentual de macrófagos pró-inflamatórios M1 marcados com CD11c (FIGURA 12C) e redução ($p=0,057$) dos antiinflamatórios M2 marcados com CD206 (FIGURA 12D).

Ao contrário do ocorrido com os camundongos selvagens, a exposição a 1,2-NQ modulou o percentual de macrófagos M1 pró-inflamatórios dos animais TNFR1KO que apresentaram redução no percentual desses fagócitos mononucleares marcados com CD11c (FIGURA 19C). Nesse sentido, os animais TLR4KO também não tiveram aumento no percentual de macrófagos M1, caracterizando então um possível efeito protetor em ambas as linhagens devido à ausência dos receptores TNFR1 e TLR4 nesses roedores (FIGURA 19C). A exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ não alterou o percentual de macrófagos antiinflamatórios M2 marcados com CD206 no estudo com os organismos geneticamente modificados (FIGURA 19D).

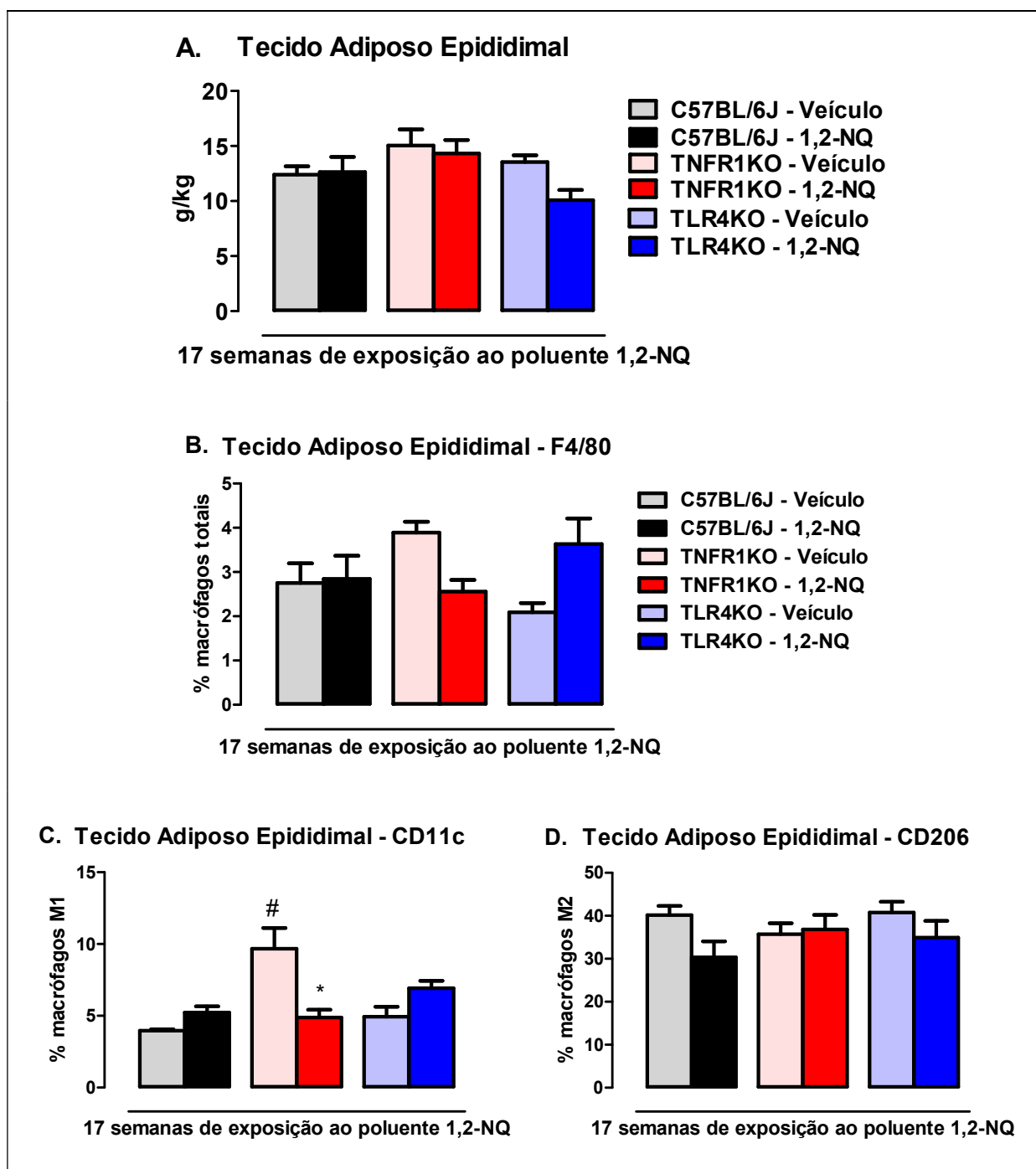


Figura 19. Perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal dos camundongos geneticamente modificados. 5 dias após 17 semanas de exposição ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ, sendo: (A) Massa do tecido adiposo epididimal; (B) % de macrófagos totais marcados com F4/80; (C) % de macrófagos M1 marcados com CD11c; (D) % de macrófagos M2 marcados com CD206 (A-D) Média $\pm$ EPM, $n = 5$ (C57BL/6J, TNFR1KO, TLR4KO expostos ao veículo do poluente e TLR4KO exposto a 1,2-NQ), $n = 6$ (C57BL/6J exposto a 1,2-NQ) e $n = 7$ (TNFR1KO exposto a 1,2-NQ). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (comparação entre grupos da mesma linhagem) e $\#p < 0,05$ (comparação entre TNFR1KO/TLR4KO e C57BL/6J submetidos ao mesmo tratamento).

5.15 Resumo dos resultados fisiológicos e perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal

No estudo com os camundongos C57BL/6J, a exposição subcrônica ao poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) não foi capaz de causar efeito cumulativo na massa corporal (FIGURA 6B). Por outro lado, a ingestão alimentar foi cumulativamente menor em relação aos animais expostos ao veículo do poluente. (FIGURA 7B). Em 6 semanas de exposição ao poluente já foi possível observar aumento no consumo de oxigênio e produção de gás carbônico, assim como também no gasto energético noturno (FIGURA 8). No ITT, foram observadas maior tolerância à insulina na curva glicêmica após 8 semanas de exposição a 1,2-NQ (FIGURA 9). Por outro lado, no GTT, os animais apresentaram intolerância à glicose após 9 semanas de exposição ao poluente, acompanhada de aumento da glicemia após 12 horas de jejum (FIGURA 10). Na composição corporal realizada por tomografia computadorizada (CT), após 14 semanas de exposição a 1,2-NQ, não foram observadas diferenças nas massas magra, gorda e óssea (FIGURA 11). Em complemento, a exposição subcrônica ao poluente atmosférico não alterou a massa adiposa epididimal na dissecação pós-eutanásia, porém, houve aumento no percentual de macrófagos pró-inflamatórios M1 e redução de macrófagos antiinflamatórios M2 ($p=0,057$) (FIGURA 12).

No estudo com os camundongos geneticamente modificados em relação ao C57BL/6J, os animais *knockouts* para TNFR1 e TLR4 permaneceram com as massas corporais cumulativas inalteradas após 17 semanas de exposição a 1,2-NQ (FIGURA 13). Por outro lado, os animais TNFR1KO estiveram protegidos da redução cumulativa na ingestão alimentar e os TLR4KO super compensaram o efeito, comendo mais (FIGURA 14). Além disso, ambas as linhagens mantiveram o padrão de aumento no consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e gasto energético (FIGURA 15). Aumento na tolerância à insulina foi também observado em todas as linhagens estudadas com ênfase nos camundongos TLR4KO devido ao gráfico da área sob a curva (FIGURA 16). Em complemento, ambos os animais TNFR1KO e TLR4KO estiveram protegidos do aumento da glicemia de jejum e da intolerância à glicose, mas nos camundongos TNFR1KO esses efeitos foram mais evidentes (FIGURA 17). Na composição corporal, houve redução na massa magra dos TNFR1KO e TLR4KO expostos a 1,2-NQ e aumento na massa óssea dos TNFR1KO

(FIGURA 18). Os animais geneticamente modificados tiveram o mesmo padrão de inalterabilidade na massa do tecido adiposo epididimal e no percentual de macrófagos M2, porém, os camundongos TNFR1KO tiveram redução no percentual de macrófagos M1 (FIGURA 19).

Análises	C57BL/6J	TNFR1KO	TLR4KO
Evolução da Massa Corporal	↓	-	↓
Percentual de Massa Magra	-	↓	-
Percentual de Massa Gorda	-	-	-
Evolução da Ingestão Alimentar	↓	-	↑
Consumo de O₂	↑	↑	↑
Liberação de CO₂	↑	↑	↑
Quociente Respiratório	-	-	-
Gasto Energético	↑	-	↑
Tolerância à Insulina	↑	↑	↑
Tolerância à Glicose	↓	-	-
Glicemia - Jejum 12h	↑	-	-
Massa Adiposa Branca Epididimal	-	-	-
% de Macrófagos Totais (F4/80) no Tecido Adiposo Branco Epididimal	-	-	-
Percentual de Macrófagos Pró-Inflamatórios M1 (CD11c) no Tecido Adiposo Branco Epididimal	↑	↓	-
Percentual de Macrófagos Antiinflamatórios M2 (CD206) no Tecido Adiposo Branco Epididimal	↓*p=0,057	-	-

Tabela 2. *Resumo dos resultados fisiológicos referentes a homeostase energética e perfil inflamatório do tecido adiposo branco epididimal.* ↑ aumento em relação ao controle; ↓ redução em relação ao controle; - sem alterações estatisticamente significantes; ANOVA de uma/duas seguida dos pós-testes de Bonferroni/Tukey ou Teste t não pareado bicaudal, (↑↓) p<0,05 e (–) p>0,05, comparação entre animais da mesma linhagem expostos a 1,2-NQ e ao veículo do poluente.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a exposição subcrônica a 1,2-NQ nos animais selvagens promove leve perda de massa corporal e um desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. Apesar de não ter sido observada a alteração da massa do tecido adiposo, houve aumento significativo do percentual de macrófagos pró-inflamatórios M1 (CD11c) e redução ($p=0,057$) do percentual de macrófagos antiinflamatórios M2 (CD206) no tecido adiposo branco epididimal após exposição subcrônica a 1,2-NQ. A deleção do TNFR1 e TLR4 protegeu, pelo menos em parte, desses efeitos deletérios da exposição a 1,2-NQ.

A poluição atmosférica tem sido descrita como capaz de causar desequilíbrio na tríade da homeostase energética, sendo ela composta pela massa corporal, ingestão alimentar e gasto energético, podendo ter relação com doenças metabólicas (AN et al., 2018; DA SILVEIRA et al., 2018; USTULIN et al., 2018). Porém, não se sabe qual ou quais componentes tóxicos existentes na poluição atmosférica estão causando esses efeitos no metabolismo. Por isso, este estudo se preocupou em investigar o efeito do poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona isoladamente e verificar a sua capacidade de causar alterações na homeostase energética e no perfil inflamatório do tecido adiposo branco.

Recentemente, em um trabalho realizado no nosso grupo e ainda não publicado, foi revelado que a exposição subcrônica ao MP_{2,5} aumentou o peso e a ingestão alimentar e reduziu o gasto energético em camundongos C57BL/6J. Além desses efeitos, foram observados também aumento da massa adiposa branca, resistência hipotalâmica à leptina, redução de UCP1 no tecido adiposo marrom e aumento da leptina e insulina circulantes. No presente estudo optou-se por investigar o efeito de um dos poluentes que compõe o MP_{2,5}, a 1,2-NQ, derivada da combustão do diesel sobre a homeostase energética e verificou-se leve redução do ganho ponderal dos animais selvagens expostos. Esse resultado pode ter sido corroborado pela ingestão alimentar cumulativa reduzida. O aumento do consumo de O₂ foi observado nesses mesmos animais o que seria incoerente com os dados de massa corpórea e ingestão alimentar. Cabe ressaltar que a medida de consumo de O₂ foi realizada uma vez apenas durante todo o tempo de exposição e estava aumentado em todas as linhagens estudadas, refletindo talvez um efeito mais agudo da exposição a 1,2-NQ. Os camundongos TNFR1KO estiveram protegidos da

redução da ingestão alimentar e os TLR4KO apresentaram o efeito oposto, consumindo mais ração. Esses dados mostram o possível papel dos receptores TNFR1 e TLR4 no controle da ingestão alimentar após a exposição subcrônica ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ.

Um dos fatores que poderia explicar a redução da ingestão alimentar nos camundongos selvagens é a capacidade da 1,2-NQ inibir a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), um importante regulador negativo da sinalização da insulina e leptina (AHN et al., 2002; SUN et al., 2016). PTP1B é um membro da família das PTPs e sua principal função é desfosforilar os resíduos de tirosina fosforilados (LEE; WANG, 2007). Com isso, tem-se postulado que a PTP1B desfosforila a JAK2 e a STAT3 ativada e impede a transdução do sinal da leptina (LUND et al., 2005). Portanto, seus inibidores, como a 1,2-NQ, realçariam os sinais da leptina, reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético. Camundongos deficientes de PTP1B neuronal reduziram peso corporal e adiposidade, com aumento da atividade espontânea e o gasto energético em dieta hiperlipídica crônica (BENCE et al., 2006). A inibição da PTP1B neuronal resulta na redução da atividade da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) hipotalâmica, levando a alterações *downstream* na expressão gênica que aumentam o gasto energético (MARTIN et al., 2006). A redução de PTP1B em neurônios leva a supressão da atividade $\alpha 2$ AMPK hipotalâmica e ativação da $\alpha 2$ AMPK no músculo e no tecido adiposo marrom. Essas alterações na atividade da AMPK estão acompanhadas pela indução de genes que regulam o tipo de fibra muscular, biogênese mitocondrial, UCPs (proteínas de desacoplamento), oxidação de ácidos graxos, resultando em alterações metabólicas que contribuem para o aumento do gasto energético (XUE et al., 2009).

Em nosso estudo, após 6 semanas de exposição a 1,2-NQ observamos aumento no gasto energético noturno em todas as linhagens estudadas, entretanto, faz-se necessário estudos adicionais para saber se a PTP1B e/ou AMPK estão envolvidas nessa resposta.

Outra possível hipótese para o aumento do gasto energético noturno nos animais expostos ao poluente poderia ser a 1,2-NQ ou um subproduto estar chegando até o tecido adiposo marrom (BAT), causando inflamação local com aumento da marginação e migração de monócitos no tecido inflamado com comprometimento no gasto energético. Nesse sentido, a mutagênese do regulador de transcrição nuclear Mecp2 (proteína de ligação a metil-CpG 2) em macrófagos

residentes no BAT resulta em obesidade espontânea que está ligada a alteração do gasto energético e comprometimento da termogênese homeostática, pois, camundongos com deficiência de *Mecp2* no subconjunto de macrófagos *Cx3Cr1+* localizados no BAT ostentam baixa expressão de fatores termogênicos, como por exemplo, a UCP1 em consequência do comprometimento da inervação simpática com redução de noradrenalina (WOLF et al., 2017). Como efeito inverso, em nosso estudo existiria então a possibilidade do aumento crônico de macrófagos normais devido à inflamação local no BAT, com aumento proporcional de *Mecp2*, o que em teoria poderia levar ao aumento do gasto energético.

A diabetes tipo 2 é caracterizado por concentrações de glicose elevadas, resistência à insulina e deficiência de sua secreção pela célula beta pancreática como forma de compensar a resistência ao hormônio. A poluição atmosférica, principalmente na sua forma mais estudada, o $MP_{2,5}$, pode comprometer a função da célula beta pancreática (ALDERETE et al., 2018). Em nosso estudo, a exposição subcrônica de 8 semanas a 1,2-NQ resultou em maior tolerância à insulina em todas as linhagens estudadas com ênfase estatística para os camundongos *knockouts* para TLR4 no cálculo da área sob a curva. Por outro lado, os animais selvagens C57BL/6J apresentaram aumento da glicemia de jejum e intolerância à glicose.

Uma possível explicação para a intolerância à glicose nos camundongos selvagens C57BL/6J expostos a 1,2-NQ seria o comprometimento da produção de insulina pelas células beta pancreáticas. Em teoria, a 1,2-NQ ou um subproduto poderia chegar ao pâncreas e causar inflamação local, comprometendo assim, o seu funcionamento adequado. Em adição, a maior tolerância à insulina encontrada em todas as linhagens expostas ao poluente químico atmosférico poderia ser também explicada pela capacidade da 1,2-NQ inibir a PTP1B (AHN et al., 2002). Essa proteína é expressa em vários tecidos de mamíferos, sendo um alvo farmacológico para o tratamento da diabetes tipo 2 (SUN et al., 2016). Nesse sentido, a PTP1B desfosforila os resíduos de tirosina fosforilados no receptor de insulina (IR) e nos substratos do receptor de insulina (IRSs), coordenando o balanço entre fosforilação e desfosforilação destes resíduos, os quais resultam em *downregulation* da transdução do sinal da insulina (SALMEEN et al., 2000). Por conseguinte, a alta expressão de PTP1B tecidual resulta em falha da ligação da insulina e leptina aos seus receptores, induzindo assim a resistência aos respectivos hormônios, causando obesidade e diabetes tipo 2 (SUN et al., 2016). Por outro lado, os inibidores de

PTP1B podem potencialmente melhorar a resistência à insulina e normalizar a glicose plasmática e o nível de insulina sem induzir hipoglicemia (VERMA et al., 2017). Portanto, pequenas moléculas inibidoras de PTP1B, como a 1,2-NQ, são capazes de realçar os sinais da insulina, causando maior tolerância ao hormônio. Apesar dos possíveis efeitos da PTP1B no nosso modelo, os *knockouts* para TNFR1 e TLR4 permaneceram protegidos da hiperglicemia e intolerância à glicose, ambas observadas nos animais selvagens expostos a 1,2-NQ. Isso sugere que é possível a relevância dos receptores TNFR1 e TLR4 no processo que levaram os animais selvagens a hiperglicemia e intolerância à glicose.

Quanto ao potencial inflamatório dos poluentes atmosféricos, os resultados de um estudo mostraram que a exposição aos poluentes provenientes do tráfego urbano é a que causa maior risco cardiometabólico, pois o MP_{2,5} dessas fontes é mais nocivo do que o MP_{2,5} total (WEINMAYR et al., 2015). A inflamação pulmonar induzida por exposição aos poluentes atmosféricos pode causar migração de citocinas aos outros tecidos ou promover respostas no cérebro (BLOCK; CALDERON-GARCIDUENAS, 2009). Adicionalmente, os componentes do MP_{2,5} como metais de transição e LPS podem penetrar na vascularização sistêmica ou ativar receptores *toll-like*, aumentando assim a inflamação (RAJAGOPALAN; BROOK, 2012). A exposição por 17 semanas ao MP_{2,5} ($116,9 \pm 34,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) promoveu infiltração de macrófagos no tecido adiposo visceral de camundongos C57BL/6J (LIU et al., 2014a).

Em nosso estudo, a exposição subcrônica a 1,2-NQ não alterou a massa adiposa epididimal nos camundongos selvagens C57BL/6J. Por outro lado, houve aumento de macrófagos pró-inflamatórios M1 neste mesmo tecido acompanhado de redução ($p=0,057$) de macrófagos antiinflamatórios M2, o que sugere o início de um estado de inflamação subclínica presente, que antecede o sobrepeso e a obesidade. Nos animais *knockouts* para TNFR1 e TLR4 não houve alteração da massa adiposa nem da porcentagem de macrófagos totais no tecido adiposo. Com relação ao percentual de macrófagos M1, observa-se redução nos camundongos TNFR1KO expostos a 1,2-NQ. Entretanto, não se pode descartar que essa redução foi mais decorrente do aumento de macrófagos M1 observada nos camundongos TNFR1KO expostos ao veículo do poluente.

Até o momento, não se sabe se o poluente químico atmosférico 1,2-NQ é capaz de se translocar dos alvéolos para a corrente sanguínea e causar danos

diretamente no tecido adiposo ou se os efeitos inflamatórios observados nos camundongos selvagens são decorrentes de subprodutos da inflamação pulmonar que chegaram ao tecido em questão ou ainda, se ambos os mecanismos desencadearam os resultados observados.

7 CONCLUSÕES

A exposição subcrônica ao poluente químico atmosférico 1,2-NQ não teve associação com o ganho cumulativo na massa corporal e gordura em todas as linhagens estudadas. Por outro lado, a ingestão alimentar foi cumulativamente menor nos camundongos selvagens C57BL/6J. Os animais TNFR1KO estiveram protegidos dessa redução na ingestão alimentar e os TLR4KO apresentaram efeito oposto, comendo mais. Também foram observados aumento no gasto energético noturno e maior tolerância à insulina em todas as linhagens. Por outro lado, os animais C57BL/6J tiveram maior glicemia no jejum de 12 horas e intolerância à glicose, porém os *knockouts* para TNFR1 e TLR4 permaneceram protegidos desses efeitos. No tecido adiposo branco epididimal, ao contrário dos resultados encontrados nos camundongos C57BL/6J, os quais sugerem o começo da inflamação subclínica que precede o sobrepeso e a obesidade, os animais TLR4KO e TNFR1KO estiveram protegidos do aumento de macrófagos pró-inflamatórios M1 após exposição ao poluente. Esses resultados sugerem a possível relevância dos receptores TNFR1 e TLR4 no processo que levou os animais selvagens às desordens metabólicas e inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- AHN, J. H. et al. Synthesis and PTP1B inhibition of 1,2-naphthoquinone derivatives as potent anti-diabetic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 12, n. 15, p. 1941–1946, ago. 2002.
- ALDERETE, T. L. et al. Ambient and Traffic-Related Air Pollution Exposures as Novel Risk Factors for Metabolic Dysfunction and Type 2 Diabetes. **Current epidemiology reports**, v. 5, n. 2, p. 79–91, jun. 2018.
- ALI, M. U. et al. A systematic review on global pollution status of particulate matter-associated potential toxic elements and health perspectives in urban environment. **Environmental geochemistry and health**, p. 1-32, out. 2018.
- ALLEN, J. N. et al. Isolation, Characterization, and Purification of Macrophages from Tissues Affected by Obesity-related Inflammation. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 122, p. 1-13, abr. 2017.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 42 (suppl. 1), p. s13-s28, jan. 2019.
- AN, R. et al. Impact of ambient air pollution on obesity: a systematic review. **International journal of obesity (2005)**, v. 42, n. 6, p. 1112–1126, jun. 2018.
- BENCE, K. K. et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 917–924, ago. 2006.
- BLOCK, M. L.; CALDERON-GARCIDUENAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 9, p. 506–516, set. 2009.
- BOLTON, J. L. et al. Role of quinones in toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135–160, mar. 2000.
- BOLTON, J. L. et al. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 11, p. 4743–4754, nov. 2012.

BRAGA, A. et al. Poluição atmosférica e saúde humana. **Revista USP**, v. 0, n. 51, p. 58–71, nov. 2001.

BRUNMARK, A.; CADENAS, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. **Free radical biology & medicine**, v. 7, n. 4, p. 435–477, set. 1989.

CHO, A. K. et al. Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM_{2.5} Special Issue of *Aerosol Science and Technology* on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program. **Aerosol Science and Technology**, v. 38, n. sup1, p. 68–81, dez. 2004.

CHUNG, S. W. et al. Activation of 5-lipoxygenase and NF-kappa B in the action of acenaphthenequinone by modulation of oxidative stress. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 152–158, jan. 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de qualidade do ar, 2002. **CETESB**, São Paulo. p. 132. 2003.

COSTA, S. K. P. et al. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). **Archives of toxicology**, v. 84, n. 2, p. 109–117, fev. 2010.

DA SILVEIRA, C. G. et al. Subchronic air pollution exposure increases highly palatable food intake, modulates caloric efficiency and induces lipoperoxidation. **Inhalation toxicology**, p. 1–11, nov. 2018.

ELMQUIST, J. K.; SCHERER, P. E. The cover. Neuroendocrine and endocrine pathways of obesity. **JAMA**, v. 308, n. 11, p. 1070–1071, set. 2012.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19–23, 2005.

HO, K. F. et al. Carbonaceous characteristics of atmospheric particulate matter in Hong Kong. **The Science of the total environment**, v. 300, n. 1–3, p. 59–67, dez. 2002.

HU, Z. et al. Inactivation of TNF/LT locus alters mouse metabolic response to concentrated ambient PM_{2.5}. **Toxicology**, v. 390, p. 100–108, set. 2017.

INOUE, K. et al. Naphthoquinone enhances antigen-related airway inflammation in mice. **The European respiratory journal**, v. 29, n. 2, p. 259–267, fev. 2007.

JOHNSON, G. B.; BRUNN, G. J.; PLATT, J. L. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 1, p. 20–24, jan. 2004.

KELISHADI, R. et al. Lifestyle and environmental factors associated with inflammation, oxidative stress and insulin resistance in children. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 1, p. 311–319, mar. 2009.

KODAVANTI, U. P. Stretching the stress boundary: Linking air pollution health effects to a neurohormonal stress response. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1860, n. 12, p. 2880–2890, dez. 2016.

KUMAGAI, Y. et al. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. **Chemical research in toxicology**, v. 15, n. 4, p. 483–489, abr. 2002.

KUZMICH, N. N. et al. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines**, v. 5, n. 4, p. 1–25, out. 2017.

LAVRICH, K. S. et al. Investigating mitochondrial dysfunction in human lung cells exposed to redox-active PM components. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 342, p. 99–107, mar. 2018.

LEE, S.; WANG, Q. Recent development of small molecular specific inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B. **Medicinal research reviews**, v. 27, n. 4, p. 553–573, jul. 2007.

LI, R.; ZHOU, R.; ZHANG, J. Function of PM_{2.5} in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases. **Oncology letters**, v. 15, n. 5, p. 7506–7514, maio 2018.

LIN, C.-H. et al. Disparity in the induction of glutathione depletion, ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and apoptosis by quinonoid derivatives of naphthalene in human cultured cells. **Chemico-biological interactions**, v. 165, n. 3, p. 200–210, fev. 2007.

LIN, P.-H. et al. Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 8, p. 1262–1270, ago. 2005.

LIU, C. et al. Epidemiological and experimental links between air pollution and type 2 diabetes. **Toxicologic pathology**, v. 41, n. 2, p. 361–373, fev. 2013.

LIU, C. et al. Air pollution-mediated susceptibility to inflammation and insulin resistance: influence of CCR2 pathways in mice. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 1, p. 17–26, jan. 2014a.

LIU, C. et al. Exaggerated effects of particulate matter air pollution in genetic type II diabetes mellitus. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, p. 27, maio 2014b.

LIU, C. et al. Associations between long-term exposure to ambient particulate air pollution and type 2 diabetes prevalence, blood glucose and glycosylated hemoglobin levels in China. **Environment international**, v. 92–93, p. 416–421, mar. 2016.

LUND, I. K. et al. Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 2, p. 339–351, abr. 2005.

LUO, B. et al. Impact of probable interaction of low temperature and ambient fine particulate matter on the function of rats alveolar macrophages. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 49, p. 172–178, jan. 2017.

MARTIN, T. L. et al. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 28, p. 18933–18941, jul. 2006.

MAZIDI, M.; SPEAKMAN, J. R. Ambient particulate air pollution (PM_{2.5}) is associated with the ratio of type 2 diabetes to obesity. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9144, ago. 2017.

MCCONNELL, R. et al. Does near-roadway air pollution contribute to childhood obesity? **Pediatric obesity**, v. 11, n. 1, p. 1–3, fev. 2016.

MENDEZ, R. et al. Exposure to fine airborne particulate matter induces macrophage infiltration, unfolded protein response, and lipid deposition in white adipose tissue. **American journal of translational research**, v. 5, n. 2, p. 224–234, mar. 2013.

NISHIMURA, S. et al. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 2, p. 710–721, fev. 2008.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 5, p. 2777–2782, set. 2005.

RAJAGOPALAN, S.; BROOK, R. D. Air pollution and type 2 diabetes: mechanistic insights. **Diabetes**, v. 61, n. 12, p. 3037–3045, dez. 2012.

SALMEEN, A. et al. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. **Molecular cell**, v. 6, n. 6, p. 1401–1412, dez. 2000.

SANDSTROM, T.; NOWAK, D.; VAN BREE, L. Health effects of coarse particles in ambient air: messages for research and decision-making. **The European respiratory journal**, v. 26, n. 2, p. 187-188, ago. 2005.

SANTOS, K. T. et al. Early postnatal, but not late, exposure to chemical ambient pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 8, p. 1589–1605, ago. 2014.

SARMENTO, D. M. **Avaliação dos níveis de radiação ambiental no laboratório de tomografia por emissão de pósitrons acoplada a tomografia computadorizada, microPET/CT**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 85. 2016.

SHENG, K.; LU, J. Typical airborne quinones modulate oxidative stress and cytokine expression in lung epithelial A549 cells. **Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 52, n. 2, p. 127–134, jan. 2017.

SHINKAI, Y. et al. Redox cycling of 1,2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 6, p. 1222–1230, jun. 2012.

SUN, J. et al. PTP1B, A Potential Target of Type 2 Diabetes Mellitus. **Molecular Biology**, v. 5, n. 4, p. 2–7, set. 2016.

SUN, Q. et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity. **Circulation**, v. 119, n. 4, p. 538–546, fev. 2009.

TAKANO, H. et al. Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 9, p. 1329–1335, maio 2002.

TEICHERT, T. et al. Association between traffic-related air pollution, subclinical inflammation and impaired glucose metabolism: results from the SALIA study. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83042, dez. 2013.

USTULIN, M. et al. Air Pollution Has a Significant Negative Impact on Intentional Efforts to Lose Weight: A Global Scale Analysis. **Diabetes & metabolism journal**, v. 42, n. 4, p. 320–329, ago. 2018.

VAN BERLO, D.; HULLMANN, M.; SCHINS, R. P. F. Toxicology of ambient particulate matter. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, v. 101, p. 165–217, 2012.

VERAS, M. M. et al. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 13, n. 1, p. 1–15, jan. 2010.

VERMA, M. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents - A brief review. **Bioorganic chemistry**, v. 70, p. 267–283, fev. 2017.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. **The FEBS journal**, v. 278, n. 6, p. 862–876, abr. 2011.

WEINMAYR, G. et al. Long-term exposure to fine particulate matter and incidence of type 2 diabetes mellitus in a cohort study: effects of total and traffic-specific air pollution. **Environmental health : a global access science source**, v. 14, p. 53, jun. 2015.

WOLF, Y. et al. Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. **Nature immunology**, v. 18, n. 6, p. 665–674, jun. 2017.

XU, X. et al. Long-term exposure to ambient fine particulate pollution induces insulin resistance and mitochondrial alteration in adipose tissue. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 124, n. 1, p. 88–98, nov. 2011a

XU, Z. et al. Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues. **Particle and fibre toxicology**, v. 8, p. 20, jul. 2011b.

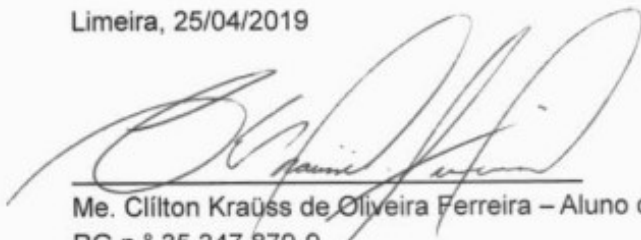
XUE, B. et al. Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4563–4573, ago. 2009.

ANEXOS**Anexo 1 Declaração de que a tese de doutorado não infringe os dispositivos da lei nº 9.610/98**

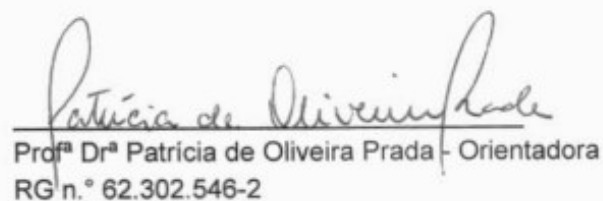
Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada: ***Efeitos da exposição crônica ao poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona na inflamação do tecido adiposo branco e desequilíbrio da homeostase energética: O papel do TNFR1 e TLR4***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Limeira, 25/04/2019



Me. Clilton Krauss de Oliveira Ferreira – Aluno de Doutorado CNEM
RG n.º 35.347.879-9



Profª Drª Patrícia de Oliveira Prada – Orientadora
RG n.º 62.302.546-2

Anexo 2 Declaração referente a bioética e biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada: ***Efeitos da exposição crônica ao poluente químico atmosférico 1,2-naftoquinona na inflamação do tecido adiposo branco e desequilíbrio da homeostase energética: O papel do TNFR1 e TLR4.***

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

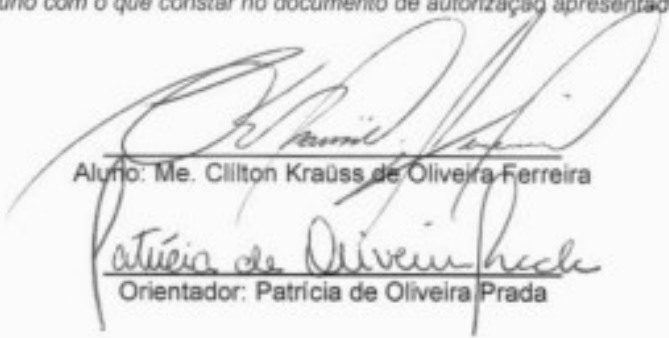
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2016/01 Instituição:
APEX/FCA/UNICAMP

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No.4628-1, Instituição*:
CEMIB/IB//UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Me. Clilton Krauss de Oliveira Ferreira


Orientador: Patrícia de Oliveira Prada

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Anexo 3 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP



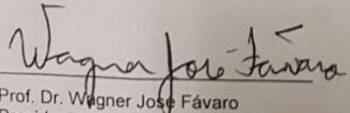

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeitos da poluição atmosférica no desenvolvimento da obesidade, registrada com o nº 4628-1/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Patricia de Oliveira Prada e Clilton Kraüss De Oliveira Ferreira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 1º de agosto de 2017.

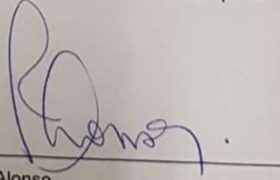
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	23/06/2017-23/06/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/08/2017-23/06/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	40
Idade / Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / TLR4-/-
No. de animais:	40
Idade / Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57B6/6 iNOS KO/ JUnib (óxido nítrico)
No. de animais:	40
Idade / Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 10 de agosto de 2017.



Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo 4 Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS
CIDADE UNIVERSITÁRIA DE LIMEIRA



Autorizo ad referendum da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA, o desenvolvimento do projeto de pesquisa regular intitulado "Efeitos da poluição atmosférica no desenvolvimento da obesidade e diabetes melito tipo 2 em camundongos C57 BL/6J e Knockouts para iNOS, TLR4 e TNFR1". (nº 2018/01) sob responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada, com vigência de março/2016 a março/2021, por estar em acordo com a legislação vigente que regulamenta as atividades que envolvem organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados.

Esta autorização será submetida à apreciação da CIBio/FCA para homologação em sua próxima reunião, prevista para o mês de outubro de 2018.

Limeira, 22 de março de 2018

Prof. Dr. Dr. Eduardo Rochete Ropelle
Presidente da CIBio/FCA (CQB: 370)
Matrícula 299090

Anexo 5 Certificado de conclusão do curso - Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório – IB/CEUA/UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**, obtendo nota **20,00**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 31 de julho de 2017.

L. Verinaud

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Professor livre-Docente
Presidente da CEUA/UNICAMP

Anexo 6 Comprovante de submissão de artigo científico em revista indexada

3/04/2019
My Co-authored Submission

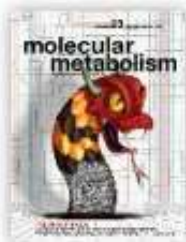
ELSEVIER

Clilton Ferreira
Sign out
Help

My Co-authored Submissions

Molecular Metabolism
View Journal

Follow
+ Start new submission



Full Length Article | MOLMET_2019_373

☐ Exposure to air pollution (PM_{2.5}) leads to leptin resistance, hyperphagia, and obesity by inducing hypothalamic inflammation via TLR4/IKK ϵ pathway

Patricia Prada, Ana Paula Dornellas, Clara Campolim, Clilton Ferreira, Gisele Castro, Jose Donato, Lais Claro, Mariana Veras, Mario Saad, Olivia Pizetta Zordão, Paula Gabriele Fernandes Quaresma, Paulo Saldiva, RAQUEL PATRICIA LIMA, Tamires Zanotto, Vitor Boico

Submitted 30 Apr 2019

With Editor 30 Apr 2019
View details