



TELMO OLIVEIRA BITTAR

“ESTUDO DOS EFEITOS DO MATERIAL PARTICULADO PROVENIENTE DA
BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE APARELHO RESPIRATÓRIO E
CIRCULATÓRIO DE RATOS WISTAR COMBINADOS OU NÃO COM A INFECÇÃO
ESTAFILOCÓCICA”

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

TELMO OLIVEIRA BITTAR

“ESTUDO DOS EFEITOS DO MATERIAL PARTICULADO PROVENIENTE
DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE APARELHO RESPIRATÓRIO E
CIRCULATÓRIO DE RATOS WISTAR COMBINADOS OU NÃO COM A INFECCÃO
ESTAFILOCÓCICA”

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do
título de doutor em Odontologia na
área de Saúde Coletiva

Este exemplar corresponde a versão final
da tese defendida pelo aluno Telmo
Oliveira Bittar e orientada pelo prof. Dr.
Antonio Carlos Pereira

PIRACICABA

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

B548e Bittar, Telmo Oliveira, 1976-
Estudo dos efeitos do material particulado proveniente da biomassa de cana-de-açúcar sobre o aparelho respiratório e circulatório de ratos wistar combinados ou não com a infecção estafilocócica / Telmo Oliveira Bittar. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Antonio Carlos Pereira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ar - Poluição. 2. Cana-de-açúcar. 3. Rato. I. Pereira, Antonio Carlos, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the effects of particulate matter from sugarcane biomass over wistar rats respiratory and circulatory systems combined or not with staphylococcal infection

Palavras-chave em inglês:

Air pollution

Sugarcane

Rat

Área de concentração: Saúde Coletiva

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Antonio Carlos Pereira [Orientador]

Rogério Heládio Lopes Motta

Fernanda Lopes da Cunha

Arsenio Sales Peres

Luciane Miranda Guerra

Data de defesa: 03-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 03 de Julho de 2013, considerou o candidato TELMO OLIVEIRA BITTAR aprovado.



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PEREIRA



Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA



Profa. Dra. FERNANDA LOPES DA CUNHA



Prof. Dr. ARSENIO SALES PERES



Profa. Dra. LUCIANE MIRANDA GUERRA

Agradecimentos

Ao magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira, como fonte de conhecimento, amizade, companheirismo, carinho e principalmente competência.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim, amigo e colaborador.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, amigo e colaborador, sem ajuda do qual este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela amizade e colaboração.

Ao colaborador Vinícius Marconi, pela ajuda e amizade.

À Prof. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury pelo carinho e amizade.

Aos alunos Luciana Berto, Luiz Ferreira, Bruno Vilela e Sidnei Figueroba pela colaboração.

Resumo

Inúmeros relatos da literatura apontam para associações entre poluição atmosférica e patologias do aparelho respiratório e cardíaco. O objetivo deste estudo foi averiguar os efeitos do material particulado oriundo da queima da biomassa da cana-de-açúcar no aparelho respiratório e cardíaco de ratos machos *wistar*. Utilizou-se de um forno especialmente desenhado para coletar o material particulado proveniente da palha da cana-de-açúcar e então isolá-lo. Sua análise química foi feita por cromatografia gasosa. Posteriormente foram alocados 4 grupos, de 7 ratos cada, dividindo-os na seguinte ordem: grupo I- recebeu instilação de material particulado em soro fisiológico; grupo II- recebeu instilação de material particulado e *S. aureus*; grupo III- controle, recebeu apenas instilação de soro fisiológico; grupo IV- recebeu apenas instilação de *S. aureus*. Após o período de uma semana, os animais foram eutanasiados, e foram coletadas amostras de pulmão, traquéia e coração para análise histológica, morfométrica e de imunoensaio. A metodologia utilizada para análise histológica e morfométrica foi a de comparação ao padrão de normalidade, e teste ELISA de captura no imunoensaio para as seguintes citocinas: GRO- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ , TNF- α . Os resultados analisados mostraram que o principal componente encontrado no material particulado de cana de açúcar foi o éster de ácido ftálico. Não houve nenhuma alteração estatística entre os grupos em relação ao tecido cardíaco. A análise histológica revelou alteração no padrão de normalidade apenas no grupo IV. Na análise morfométrica da traquéia, foi observada uma redução no espessamento do tecido conjuntivo no grupo II, e nas medidas de centro, todos os grupos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Em relação ao imunoensaio, observou-se que os grupos I e II expressaram a liberação de IL-1 α em relação ao controle. O grupo I apresentou expressão significativa de IL-6 em relação ao controle e grupo IV, e de IL-1 β e IFN- γ com relação aos demais grupos. Deste modo, o presente estudo mostrou que o material particulado, oriundo da queima da biomassa da cana-de-açúcar, é capaz de provocar alteração no aparelho respiratório de ratos *wistar* e motivar a produção de citocinas.

Palavras chave: Rato, Poluição do Ar, Cana-de-Açúcar

Abstract

Several studies point out the association between atmospheric pollution and pathologies from respiratory and cardiac systems. The aim of this study was to analyze the effects of the particulate matter from sugar cane biomass in respiratory and cardiac systems of male *wistar* rats. It was used a special developed oven to collect the sugar cane particulate matter and so isolate it. Its chemical analysis was done by gas chromatography. Later it was allocated 4 groups each one with 7 rats been divided into: group I- received instillation of only particulate mater in physiological saline; group II- received particulate matter plus *S. aureus*; group III- control group with only physiological saline; group IV- received only *S. aureus*. After one week, the animals were euthanized and samples were gathered from lung, heart and trachea tissues to histological, morphometric and immunoassays analysis. The histological and morphometric employed methodology was the normality standard variation and ELISA capture test for immunoassays for the following cytokines: GRO- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ , TNF- α . Analyzed results shown the main substance found in sugar cane particulate matter was phthalic acid ester. None standard variation statically for heart tissue was found. Histological analysis revealed changes in the normal pattern only in group IV. In trachea morphometric analysis it was observed the decreasing in its conjunctive tissue width for group II, and in its center measurement all the groups presented significant difference when compared to control group. In the immunoassays it was noted that group I and II expressed the production of IL-1 α when compared to control group. The group I presented a significant expression of IL-6 compared to control group and group IV; and IL-1 β e IFN- γ when compared to the other groups. Based on this achieves, the present study has shown the sugar cane particulate matter is capable to produce alteration in respiratory system of *wistar* rats and motivate cytokines production.

Key words: Rat, Air Pollution, Sugarcane

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
3 PROPOSIÇÃO.....	09
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
5 RESULTADOS.....	15
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO.....	34

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar e etanol da cana-de-açúcar no mundo. Embora a colheita mecânica tenha se intensificado, a colheita manual ainda predomina empregando cerca de 500 mil trabalhadores em todo país (Barbosa *et al.*, 2012).

O manejo utilizado nas lavouras de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), é considerado prejudicial à saúde devido ao emprego corriqueiro da queima da palha previamente a sua colheita. Essa queima produz uma fuligem rica em material particulado (PM), poluente este considerado nocivo e causador de efeitos deletérios à saúde humana. Este material particulado é todo tipo de poeira que se encontra suspenso na atmosfera, sendo dividido em 3 tipos de partículas de acordo com seu diâmetro: grossa de 10µm, fina de 2,5 µm e ultrafina de 0,1 µm, sendo que estas partículas possuem a capacidade de penetrar nas vias aéreas e causar reações inflamatórias nos alvéolos pulmonares (Arbex *et al.*, 2004).

Em estudo realizado por Zancul (1998) foi observado que a emissão de material particulado na região metropolitana de São Paulo por veículos automotivos era de aproximadamente 62 toneladas/dia, ao passo que a emissão de material particulado proveniente da queima da palha das lavouras de cana-de-açúcar poderia chegar a 285 toneladas/dia em regiões próximas de lavouras que utilizam a queima da palha previamente a sua colheita.

A poluição ambiental tem demonstrado exaustivamente como fonte geradora de efeitos deletérios a saúde humana, em especial gerando problemas cardiorrespiratórios. Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a exposição ao material particulado está associada ao aumento de risco de saúde na infância, exacerbação de sintomas respiratórios tais como asma, e aumento na admissão hospitalar. Estudos recentes documentaram os efeitos adversos do material particulado sobre a saúde infantil causando mortalidade infantil devido a redução da função cardiopulmonar (WHO, 2005; Yoshida *et al.*, 2012).

Uma associação positiva entre a concentração ambiente de material particulado e relatos de caso de morbidade pulmonar e cardíacos tem sido observada (Doll, 1978; Silbajoris *et al.*, 2011). Poluentes ambientais podem desencadear respostas desfavoráveis principalmente sobre o sistema respiratório humano que é umas das principais áreas

expostas à poluição ambiente (Gulisano *et al.*, 1995; Foltinová *et al.*, 2002; Danielsen *et al.*, 2010).

A Poluição do ar é uma das grandes responsáveis por doenças cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca congestiva (Schwartz, 1999), doença coronariana (Ruckerl *et al.*, 2006), e infarto agudo do miocárdio (Peters *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos têm reportado uma consistente associação entre exposição de partículas de poluição do ar com diâmetro $<10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) e mortalidade e morbidade cardiorrespiratória (Brunekreef & Holgate, 2002; Schwartz, 1997).

Partículas finas e ultrafinas (diâmetro $< 2,5 \mu\text{m}$) têm um papel importante nas mudanças patofisiológicas pulmonares (Samet *et al.*, 2000). As partículas inaladas podem levar a inflamações pulmonares e subsequente liberação de mediadores solúveis que influenciam os parâmetros, entre eles a coagulação sanguínea (Donaldson *et al.*, 2008). Apesar da relação entre níveis de partículas e taxas de mortalidade e morbidade por doenças respiratórias e cardiovasculares estarem bem estabelecidas, os mecanismos responsáveis por essa associação ainda não estão completamente estabelecidos (Koenig, 1993; Kodavanti *et al.*, 2002; Kodavanti *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).

A inalação de partículas PM_{10} pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios (citocinas) pelos macrófagos alveolares, células epiteliais e outras células pulmonares (van Eeden *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* usando macrófagos alveolares e células epiteliais do pulmão respondem às partículas PM_{10} resultando na amplificação da produção destes mediadores, a qual pode conduzir a alterações em muitos processos metabólicos como fagocitose, proliferação e apoptose (Becker *et al.*, 2003; Poma *et al.*, 2006).

Tem se tornado claro que a exposição ao material particulado pode levar a exacerbação de várias doenças não apenas limitadas aos pulmões, mas também ao sistema circulatório. Estudos tem demonstrado uma associação entre poluição por material particulado e doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, bronquite e doença cardiovascular. Estudos recentes mostram também que a exposição ao material particulado pode levar a diabetes e patologia do sistema nervoso central (Van Berlo *et al.*, 2012; Lui *et al.*, 2013).

O presente estudo baseia-se no fato de que são escassos os trabalhos referentes ao material particulado proveniente da combustão da biomassa da cana-de-açúcar, abordando

seus efeitos deletérios à saúde, utilizando-se de modelos de experimentação animal para sua comprovação científica, em um país onde esta cultura agrícola se encontra em franca expansão e ainda é comum a prática do uso do fogo nestas lavouras. Optou-se também por utilizar a exposição ao material particulado combinado à infecção por *Staphylococcus aureus* para analisar diferenças entre a inflamação provocada pelo particulado e pela infecção bacteriana e ambos em conjunto, visto que os estudos neste campo são bastante escassos.

Devido a sua função biológica, os ratos têm sido animais de primeira escolha para o estudo dos efeitos toxicológicos de poluentes atmosféricos sobre o aparelho respiratório humano, uma vez que este modelo é compatível ao da função humana para respostas às agressões morfológicas e fisiopatológicas, segundo apontam Harkema *et al.* (1993) e Mauderly (1996). Por tal motivo, optou-se por utilizar ratos *wistar* no presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O corte da cana-de-açúcar é mecanizado em 25% da produção brasileira e 40% da produção paulista, sendo que o restante é cortado manualmente após queima da lavoura pré-corte (Ribeiro, 2008).

O material particulado oriundo da biomassa é o que apresenta maior toxicidade e o que tem sido mais estudado pelos pesquisadores. Ele é constituído 94% por partículas finas e ultrafinas, partículas estas responsáveis por desencadear doenças no aparelho respiratório e motivar a produção de fatores pró-inflamatórios (Arbex et al. 2004).

Estudos internacionais e nacionais reportam a associação entre episódios agudos de poluição do ar atmosférico, similares aos gerados pela queima das lavouras de cana-de-açúcar, e a ocorrência de óbitos e internações hospitalares por problemas cardio-respiratórios, dentre os quais pode-se aqui citar o caso da poluição em Londres, em 1952, que registrou um incremento de aproximadamente 4000 óbitos. Em todos os casos de poluição aguda citados pela literatura, elegeu-se o material particulado inalável ($PM_{10-0,1\mu m}$) como o maior causador de efeitos deletérios a saúde humana (Logan, 1953; Freitas *et al.*, 2004).

Um número considerável de estudos epidemiológicos tem estabelecido uma associação entre a exposição a partículas de poluição e o aumento da morbidade e mortalidade por doenças pulmonares e cardiovasculares. Investigações toxicológicas em animais e humanos tem demonstrado que a curto prazo, tal exposição leva a inflamação pulmonar e sistêmica, gerando a exacerbação de doenças crônicas inflamatórias tais como asma e doença pulmonar crônica obstrutiva (Val *et al.*, 2013).

2.1 Estudos Epidemiológicos

Estudo epidemiológico conduzido na China por Zhang & Smith (2007), verificou que a utilização da queima da biomassa como fonte de energia gera um forte impacto na saúde da população exposta a este evento, dentre os quais citam: câncer de pulmão, doenças respiratórias, infecções respiratórias agudas, doença pulmonar obstrutiva crônica e comprometimento do sistema imunológico.

Pesquisas epidemiológicas amparadas por experimentos em animais apontam que a exposição a poluentes do ar no período intrauterino e pós-natal podem levar a distúrbios de crescimento pulmonar e aumentam significativamente os riscos de contrair infecções respiratórias no período pós-natal (WHO, 2005).

Estudo conduzido em pacientes cardiopatas por Ruckerl *et al.* (2007) detectou uma associação positiva entre o aumento de PM₁₀ atmosférico e os níveis de fibrinogênio no plasma sanguíneo. Este estudo também apontou que o aumento da concentração de partículas atmosféricas gerou um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6.

A exposição a poluição do ar tem sido associada a isquemia aguda e debilidade da função do miocárdio especialmente em função da composição química do material particulado, principalmente naqueles rico em vanádio e níquel (Golomb *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Pope *et al.* (1995) e Seaton *et al.* (1995) apontam que um dos principais efeitos sistêmicos do material particulado no sistema circulatório é a formação de trombos. O mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda é incerto, porém acredita-se que há um aumento na produção de fatores pró-coagulantes, como o fibrinogênio, resultante da liberação de IL-6 por macrófagos alveolares ou células epiteliais.

Wu *et al.* (2013) investigaram o aumento de pressão arterial associado a poluição por constituintes do material particulado na China, reportando aumento de pressão arterial quando estudantes foram expostos a concentrações ambientais de PM₁₀.

Kashima *et al.* (2012) evidenciaram um aumento no risco de doença cardíaca, arritmia e mortalidade por pneumonia em pessoas expostas ao particulado da poeira asiática no oeste do Japão.

Tremlová *et al.* (2013), apontaram que minerais como zinco, ferro, arsênio e cádmio presente no material particulado, podem contaminar verduras como acelga e alface, e indiretamente serem consumidos pela população.

Miller *et al.* (2007) observaram que mulheres que foram expostas a um aumento nas concentrações de material particulado de 10µg /m³ apresentavam um risco relativo RR de 1,21 para experimentar alguma doença coronariana e 1,35 de apresentar derrame.

2.2 Estudos Experimentais

Carter *et al.* (1997) apontaram que metais presentes no material particulado, em especial o vanádio ou os presentes na cinza em suspensão proveniente da queima de óleo diesel, induzem o aumento de IL-8, IL-6 e TNF em culturas celulares do aparelho respiratório humano.

Brauer (1999) expôs ratos a fumaça proveniente da queima de madeira de carvalho durante uma hora e, em seguida, os mesmos foram expostos ao *Staphylococcus aureus* por instilação intratraqueal. A bactéria mostrou-se mais virulenta no grupo exposto à fumaça que no grupo controle, sugerindo uma possível redução da resposta imunológica bronco-alveolar no grupo exposto a fumaça.

Estudo realizado por Becker & Soukup (1999) apontou que a resposta imunológica alveolar regulada por macrófagos é alterada pela presença de material particulado inalável (PM₁₀).

Ding *et al.* (2010) trataram ratos com instilação intra-traqueal de material particulado fino, e observaram inflamação pulmonar caracterizada por infiltrado de macrófago e neutrófilo causada por elevação nos valores de TNF- α , devido ao estresse oxidativo gerado nas células epiteliais das vias aéreas.

Ratos *Wistar* foram expostos a concentrações de material particulado inalável por 6 horas/dia, 1 dia/semana, durante 16 semanas consecutivas e, após este período, foram observadas degeneração multifocal do músculo cardíaco com presença de fibrose, inflamação crônica ativa e redução do número de mastócitos (Kodavanti *et al.*, 2003).

Ratos expostos a poluentes provenientes da queima de biomassa durante 70 dias, e desafiados com aerossol de ovalbumina nos quatro últimos dias após prévia sensibilização, apresentaram declínio da função pulmonar causado pela exposição ao poluente, após constatar redução de IFN- γ e aumento de IL-4 na lavagem bronco-alveolar e no plasma sanguíneo (Tesfaigzi *et al.*, 2005).

Levesque *et al.* (2011) realizaram estudos de exposição de ratos a fumaça proveniente de óleo diesel e observaram uma expressão significativa na produção de IL-6, IL-1 β , TNF- α pelas células dos tecidos cerebrais, enquanto Mogan *et al.* (2011) avaliaram o cérebro de ratos expostos a material particulado urbano administrado via aerossol e observaram a produção de IL-1 α e TNF- α pelas células do córtex cerebral.

Estudo conduzido na Nova Zelândia por Miyata *et al.* (2013), onde coelhos foram expostos ao material particulado (PM₁₀) por 4 semanas consecutivas, registrou aumento na concentração de IL-6 e IL-8 na lavagem bronco-alveolar, além de promover o recrutamento de macrófagos e células polimorfonucleares.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos, entre outras células, em resposta a microrganismos e também a outras citocinas como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Entre outros fatores que regulam sua expressão, está a produção dos hormônios estrógeno e testosterona, sendo que na menopausa e andropausa seus níveis se tornam mais elevados, mesmo na ausência de infecções. A própria hiperglicemia, característica da intolerância à glicose tem relação com a síntese imediata de IL-6, também desempenha um processo importante na ruptura ou erosão na placa de aterosclerose, tendo seus valores séricos aumentados neste evento, sendo que níveis elevados de IL-6 estão associados ao risco aumentado de isquemia do miocárdio (Gomes *et al.*, 2009).

Existem evidências científicas sugerindo uma associação entre a exposição a toxinas ambientais e a susceptibilidade à diabetes tipo 2. Este modelo estaria ligado a redução da termogênese provocando uma associação entre a exposição ao material particulado e a resistência à insulina (Lui *et al.*, 2013).

2.3 Os efeitos do Material Particulado

Estudo realizado na Inglaterra demonstrou que há uma significativa diferença na composição química do material particulado inalável grosso (10 μ m) e fino (2,5 μ m). De acordo com o estudo Willians (1999), o primeiro é composto majoritariamente de material inorgânico, enquanto o segundo contém uma porção maior de material orgânico. Devido ao seu tamanho e poder de penetração, o material particulado fino e ultrafino são considerados mais nocivos à saúde.

Estudos ocupacionais e toxicológicos apontam que os efeitos do material particulado no organismo de animais estão associados às características físico-químicas do mesmo. Assim, o estudo da composição química e forma física deste poluente, é fundamental para compreender seus efeitos deletérios no organismo animal, embora,

poucos estudos neste sentido tenham sido realizados e pouco se sabe sobre os efeitos destes componentes na fisiopatologia humana e animal (Kodavanti *et al.*, 2002).

Embora a exposição humana ao material particulado esteja associada a efeitos cardiovasculares adversos, as suas causas específicas ainda não foram elucidadas. O material particulado ambiente possui uma composição físico-química heterogênea e contém uma significativa quantidade de metais que pode ser responsabilizados pelas alterações no aparelho circulatório, dentre os quais pode-se destacar zinco, alumínio, sílica e cobre, variando o percentual de cada elemento químico na composição do material particulado em função da sua fonte e localização geográfica (Kodavanti *et al.*, 2008).

Durante a última década tem crescido a preocupação em relação à poluição por material particulado e seus efeitos deletérios sobre a saúde humana. Aos seus componentes químicos têm sido atribuído a maior parte do estresse oxidativo gerado nos alvéolos pulmonares e a consequente liberação de substâncias pró-inflamatórias (citocinas). A natureza e o grau do estresse oxidativo gerado pelo material particulado depende, portanto, de sua composição química e do grupo de células exposto ao poluente (Yang *et al.*, 2013).

A toxicidade do material particulado resulta de sua habilidade em produzir espécie reativas de oxigênio nas células epiteliais e macrófagos. Este estresse oxidativo gerado pelo particulado nestas células leva a produção de fatores pró-inflamatórios locais e sistêmicos, tais como citocinas IL-6 e IL-8 (Val *et al.*, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos deletérios do material particulado inalável proveniente da combustão da palha de cana-de-açúcar sobre aparelho respiratório e circulatório de ratos machos *Wistar* associado ou não a infecção por *Staphylococcus aureus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FOP-UNICAMP sob o número 1405-1/2007.

4.2 Seleção e Análise Físico-Química do Poluente

O material particulado inalável ($PM_{10-0,1\mu m}$) proveniente da combustão da palha de cana-de-açúcar foi obtido em um forno no qual foram adaptados filtros de papel de $10\mu m$ (Digilab Ltda, BRA), como mostra a Figura 1.

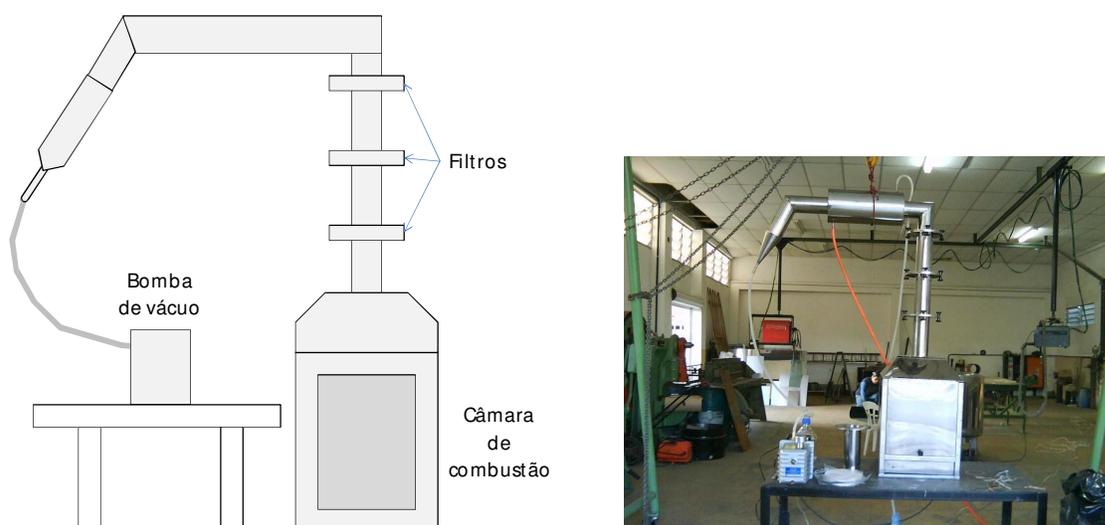


Figura 1. Desenho esquemático e fotografia do forno utilizado para obtenção das amostras de material particulado.

Uma vez obtidos os filtros impregnados com o material particulado de $10\mu m$, este foi triturado, diluído em soro fisiológico (suspensão PM_{10}) e submetido à sonicação (vibração).

Como controle foi elaborado uma suspensão com o mesmo filtro de papel não exposto ao material particulado. A análise física da forma do material particulado foi feita por observação direta em microscopia óptica binocular (Opticam, BRA), sendo que as partículas foram medidas por meio da análise das imagens no software Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA).

Para obtenção das suspensões, ambos os filtros com e sem o material particulado, foram diluídos em 100 mL de solução de NaCl a 0,9% e sonificados durante 20 minutos. Formou-se uma solução de 2mg/ml de material particulado em soro fisiológico.

A análise química do particulado foi realizada por meio de cromatografia gasosa após microextração em fase sólida (Solid Phase Micro-Extraction - SPME) pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp. Para tanto, foram adicionados 15 mL das suspensões e 2g de NaCl em um frasco, o qual foi lacrado e colocado em um banho termostaticado a 70°C, permanecendo 30 minutos sobre agitação constante. Decorrido este tempo, a fibra de SPME (PDMS-DVB 65µm) foi introduzida no frasco e exposta ao seu headspace por um período de 30 minutos, sendo imediatamente retirada e introduzida no injetor do cromatógrafo para dessorção dos analitos. A análise por GC-MS foi realizada em um Cromatógrafo HP-6890 (HP-Hewlett Packard-EUA) acoplado a detector seletivo de massas HP-5975 com coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

4.3 Seleção dos animais

Uma vez obtidas as suspensões, 28 ratos, machos jovens com 5 semanas (*Rattus norvegicus* – Wistar; adaptado de De Kwaadsteniet *et al.*, 2009) foram divididos em quatro grupos de 7 animais cada, e submetidos aos seguintes tratamentos, conforme mostra figura 2:

Grupo I - exposto ao material particulado – 40µL da suspensão do material particulado foi instilado em cada narina dos animais, uma vez ao dia, durante 7 dias (adaptado de Mazzoli-Rocha *et al.*, 2008);

Grupo II - exposto ao material particulado e à infecção estafilocócica induzida – 40µL da suspensão do material particulado foi instilado em cada narina dos animais, uma vez ao dia, durante 7 dias e, juntamente com o material particulado, foi instilado

20 μL de uma suspensão de 10^7 cfu/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (adaptado de De Kwaadsteniet *et al.*, 2009);

Grupo III - controle – sem exposição ao material particulado - foi instilado 40 μL da suspensão de filtro de papel limpo em soro fisiológico em cada narina dos animais, uma vez ao dia, durante 7 dias;

Grupo IV - exposto apenas à infecção estafilocócica – 20 μL de uma suspensão de 10^7 cfu/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (adaptado de De Kwaadsteniet *et al.*, 2009) em cada narina, durante 7 dias.



Figura 2. Tratamento da solução intranasal nos animais.

4.4 Análise Histológica e Morfométrica

Após 7 dias de tratamento, todos os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico intraperitoneal (40mg/kg) e em seguida eutanasiados por sobredose da anestesia. Após a remoção do aparelho respiratório, um pulmão foi mantido em solução de fixador (4% paraformaldeído em fosfatase salina tamponada - pH 7,2) para análise histológica. As peças foram processadas em lâminas histológicas de 6 μm , em técnica histológica padrão, coradas com HE (hematoxilina-eosina).

As lâminas de pulmão, coração e traqueia foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio óptico - Leica DLMP, equipado com câmera digital (Leica DFC-280 – Leica Microsystems-USA). Para avaliação das lesões nos pulmões foram escolhidos

campos microscópicos contendo bronquíolos, alvéolos e vasos sanguíneos. Cada estrutura foi avaliada por escores atribuídos de acordo com a intensidade das lesões (Rodrigues, 2007): grau 0 - sem alteração, grau 1 – discreto (com até 25% do campo com lesão), grau 2 – moderado (com 25% a 50% do campo com lesão), grau 3 – intenso (de 50% a 75% do campo com lesão), grau 4 – grave (de 75% a 100% do campo com lesão). As lâminas também foram classificadas de acordo com seu aspecto global. Os resultados foram obtidos pela soma de todos os parâmetros. Para o tecido cardíaco utilizou-se a mesma metodologia de escores atribuídos aos tecidos pulmonares.

As medições da espessura dos tecidos foram feitas utilizando o programa Leica Application Suite (Leica Microsystems-USA). Na traqueia foram medidas as distâncias entre a porção terminal do músculo liso até extremidade das células caliciformes (medida do comprimento mais longo) e do começo da cartilagem hialina até a extremidade das células caliciformes (medida do comprimento mais curta). De cada campo observado foram realizadas medições na região central, na borda esquerda e na borda direita.

4.5 Imunoensaio - ELISA

Um dos pulmões foi mantido a -80° Celsius e posteriormente macerado e centrifugado em 50mM tris-HCl (pH 7,5). O sobrenadante foi submetido à imunoensaio para análise da presença das citocinas GRO- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

Foram utilizadas placas de 96 poços, as quais foram cobertas com 100 μ L/poço, com anticorpos de captura para cada citocina de acordo com as instruções do fabricante (PeproTech Inc. New Jersey, USA). As placas foram deixadas à temperatura ambiente, *overnight*. Depois foram lavadas com 0,05% Tween 20 em PBS três vezes, processo repetido antes de cada etapa. Foram adicionados 300 μ L de tampão de bloqueio 1% BSA em PBS a cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora, e foram acrescentados 100 μ L das amostras (diluídas 1:2) ou das soluções-padrão.

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e 100 μ L do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e 100 μ L de uma solução de conjugado de avidina foi adicionado em cada poço. Após 20 minutos, 100 μ L de solução para substrato (ABTS) foi

adicionado. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm com correção de 650nm.

Abaixo um resumo por etapa do processo:

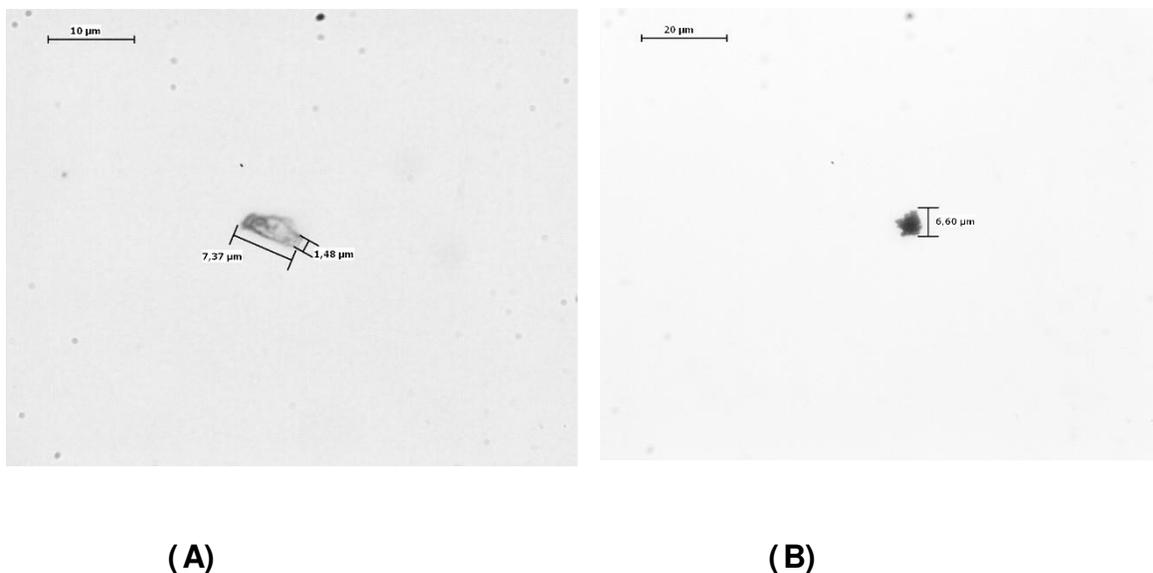
1. A placa foi revestida com anticorpos de captura para GRO- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ e TNF- α ;
2. Foram adicionadas para ligação com anticorpos de captura solução tampão de bloqueio (BSA), para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos;
3. Depois as placas foram novamente lavadas, sendo acrescentada amostra incubada em temperatura ambiente;
4. Após este período, as mesmas foram lavadas e foram adicionados anticorpos de detecção;
5. A placa foi lavada para remover a solução de avidina-peroxidase conjugado;
6. ABTS solução para substrato foram adicionados e mantidos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor;
7. A densidade óptica foi obtida a 405 nm com correção para comprimento de onda 650 nm;

4.6 Análise Estatística

Para análise das medições dos tecidos pulmonares e da traqueia utilizou-se o teste de Mann-Whitney e ANOVA (Tukey) respectivamente. Os resultados das dosagens de citocinas nos tecidos pulmonares foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas com o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Instituto Mamiramuá, Belém, PA), sendo considerado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A análise das partículas de material particulado das suspensões de PM₁₀ (A) e do controle (B) foram analisadas em microscopia óptica e foi possível observar que o tamanho médio (\pm DP) das partículas de ambas as suspensões foi de $9,3 \pm 0,81 \mu\text{m}$ conforme mostra a figura 3 abaixo.



(A) **(B)**
Figura 3. Partículas obtidas para as suspensões de PM₁₀ (A) e controle (B). Aumento 100x.

Na avaliação de cromatografia gasosa os principais componentes químicos detectados na amostra do material particulado de cana-de-açúcar foram o éster de ácido ftálico, seguido de fenol e naftalenocarboxialdeído, dentre outros, conforme mostra tabela 1 abaixo.

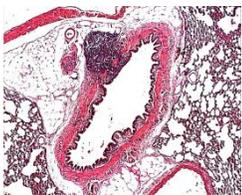
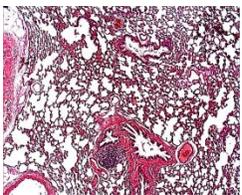
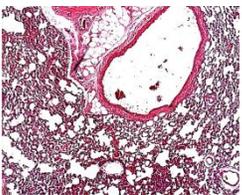
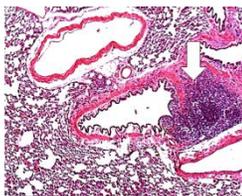
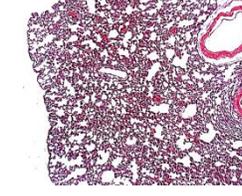
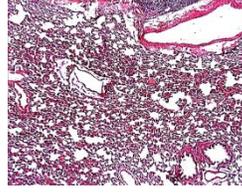
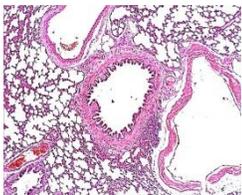
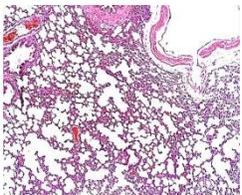
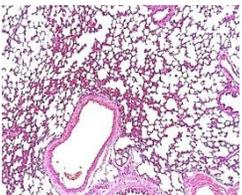
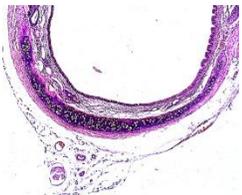
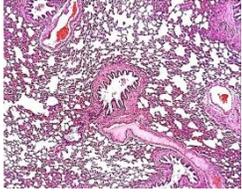
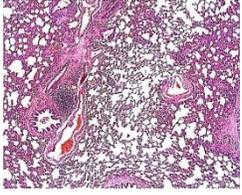
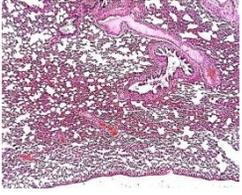
Tabela 1 - Analitos identificados na amostra do particulado de cana de açúcar.

t_R (min) ^(a)	Identificação	% relativa ^(b)
1,57	dióxido de carbono	3,14
2,75	ácido acético	1,48
6,58	furfural	2,18
12,36	benzaldeído	3,93
13,79	benzoni-trila	1,03
14,55	fenol	6,74
17,33	2-hidroxi benzaldeído	1,58
18,92	M = 120	4,77
20,36	4-metil fenol	5,06
25,02	M = 136	1,03
26,41	M = 128	4,80
30,42	2-(1-metiletil) fenol	1,63
32,91	M = 150	1,27
45,32	éster metílico do ácido 3-hidroxi benzóico	1,62
46,16	2-naftalenocarbonitrila	2,58
46,60	1-naftalenocarboxaldeído	6,63
46,80	2-naftalenocarboxaldeído	6,07
47,72	M = 184	4,65
55,31	1(2H)-acenaftilenona	3,02
59,47	9H-fluoren-9-ona	4,29
61,55	antraceno	4,20
66,94	éster de ácido ftálico	12,81
74,93	fluoranteno	2,80
77,16	n.i. ^(c)	2,48
79,71	n.i. ^(c)	10,22

^(a) – Tempo de retenção dos analitos; ^(b) - fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; ^(c) – não identificado

Conforme pode ser observado no quadro 1 abaixo, os cortes histológicos (HE, x5) dos bronquíolos, alvéolos e traqueia de um animal representativo de cada um dos 4 grupos estudados para analisar variações nos padrões de normalidade. Foram notadas em maior aumento, a presença de macrófagos e polimorfonucleares nos alvéolos pulmonares do grupo I, II e IV.

Quadro 1. Cortes histológicos (HE, 5 vezes de aumento) dos bronquíolos, alvéolos e traqueia de um animal representativo de cada grupo.

Grupo	Bronquíolo	Alvéolos	Alvéolos	Traqueia
I				
II				
III				
IV				

O grupo I e o grupo IV foram os que apresentaram escores mais elevados para os parâmetros avaliados do tecido pulmonar na soma total dos escores para alvéolo, bronquíolo e vaso sanguíneo: 14 e 14,71; respectivamente. Porém, apenas o grupo IV

apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle na soma de todos os escores conforme mostra a Tabela 2. Nela também é possível notar o percentual da área dos alvéolos e notar que quanto menor a área, maior o quadro de inflamação acometido no alvéolo. Pode-se notar que o maior quadro de inflamação foi no grupo IV com menor percentual de área alveolar 42,39 e o menor quadro de inflamação no grupo controle 53,10.

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) dos escores da avaliação histopatológica dos pulmões e área dos alvéolos pulmonares ($\% \pm DP$).

Pulmão	Alvéolo	Bronquíolo	Vaso Sanguíneo	Escore Total	Soma total	Área dos alvéolos (%)
Grupo I	3,71 \pm 0,76	3,86 \pm 0,38	3,00 \pm 1,00	3,43 \pm 0,53	14,00 \pm 1,63	47,32 \pm 3,72
Grupo II	3,71 \pm 0,49	3,43 \pm 0,79	2,57 \pm 0,53	3,14 \pm 0,69	12,86 \pm 2,04	45,39 \pm 3,69
Grupo III	3,14 \pm 0,90	3,29 \pm 0,76	2,71 \pm 0,76	3,14 \pm 0,69	12,29 \pm 2,69	53,10 \pm 10,53
Grupo IV	3,71 \pm 0,49	3,71 \pm 0,49	3,57 \pm 0,79	3,71 \pm 0,49	14,71 \pm 1,38 *	42,39 \pm 3,98

* Diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$) teste de Mann Whitney

Em relação ao tecido cardíaco, não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa.

A análise morfométrica da traqueia demonstrou uma diminuição do espessamento da camada do tecido conjuntivo subjacente ao epitélio ciliar mais acentuada no Grupo II ($PM_{10} + S. aureus$). Na medida do comprimento longo (distância entre a porção terminal do músculo liso até a extremidade das células caliciformes), o grupo II foi significativamente inferior ($p < 0,05$) em relação ao controle nas medidas da borda direita e no centro, não havendo diferença em relação aos demais grupos conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Média (\pm DP) das distâncias da porção terminal da musculatura lisa da traqueia até a extremidade das células caliciformes.

Traqueia	Distâncias entre a porção terminal do músculo liso até extremidade das células caliciformes (em μ m)		
	Borda Direita	Centro	Borda esquerda
Grupo I	271,25 \pm 100,46	300,98 \pm 83,56	268,30 \pm 104,98
Grupo II	273,68 \pm 111,67*	308,79 \pm 41,61*	272,96 \pm 81,50
Grupo III	276,35 \pm 45,57	368,09 \pm 43,52	350,06 \pm 57,07
Grupo IV	279,50 \pm 89,44	335,34 \pm 34,89	293,41 \pm 112,45

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA $p < 0,05$)

Na medida do comprimento mais curto (começo da cartilagem hialina até a extremidade das células caliciformes), o Grupo I causou diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, da espessura da borda esquerda da cartilagem hialina até a extremidade das células caliciformes. Nas medidas de centro, todos os tratamentos foram significativamente ($p < 0,05$) menores que o controle. Já na borda direita, os grupos II e IV apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Média (\pm DP) das distâncias da cartilagem hialina até a extremidade das células caliciformes.

Traqueia	Medida entre o começo da cartilagem hialina até a extremidade das células caliciformes (em μ m)		
	Borda Direita	Centro	Borda esquerda
Grupo I	101,65 \pm 43,66	109,05 \pm 25,31*	135,88 \pm 51,65*
Grupo II	135,72 \pm 75,48*	121,61 \pm 35,19*	124,13 \pm 50,29
Grupo III	149,42 \pm 42,05	169,09 \pm 33,93	179,65 \pm 53,80
Grupo IV	129,12 \pm 53,03*	123,59 \pm 34,30*	137,88 \pm 39,41

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$)

Com relação ao teste de imunoenensaio ELISA, conforme pode ser observado na figura 4, o grupo I apresentou diferença estatística na produção de IL-1 β em relação a todos os demais grupos. Os grupos I e II apresentaram maior concentração de IL-1 α em comparação com o controle. O grupo I expressou quantidades significativamente mais elevadas ($p < 0,05$) de IFN- γ com relação a todos os demais grupos, e de TNF- α em relação ao grupo IV. Nenhuma alteração foi verificada na expressão de GRO- α . A quantificação de citocinas no tecido pulmonar demonstrou um efeito acentuado do poluente sobre a liberação destes mediadores inflamatórios. O grupo I também apresentou ($p < 0,05$) uma maior expressão de IL-6 em relação ao grupo controle e o grupo IV.

Foi possível observar as diferenças na liberação de mediadores inflamatórios entre o grupo I, exposto ao material particulado, e o grupo IV, exposto apenas a infecção por *S. aureus*. Houve uma maior produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-6 no grupo I quando comparado ao grupo IV, mostrando assim uma diferença na resposta inflamatória local.

Quando se compara o grupo I, exposto ao particulado, ao grupo II, exposto ao particulado e a infecção por *S. aureus*, observou-se uma diferença na produção de apenas duas interleucinas por parte do grupo I: IL-1 β e IFN- γ .

Comparando a produção de interleucina entre os grupos II e grupo IV, não há diferença estatística significativa entre eles.

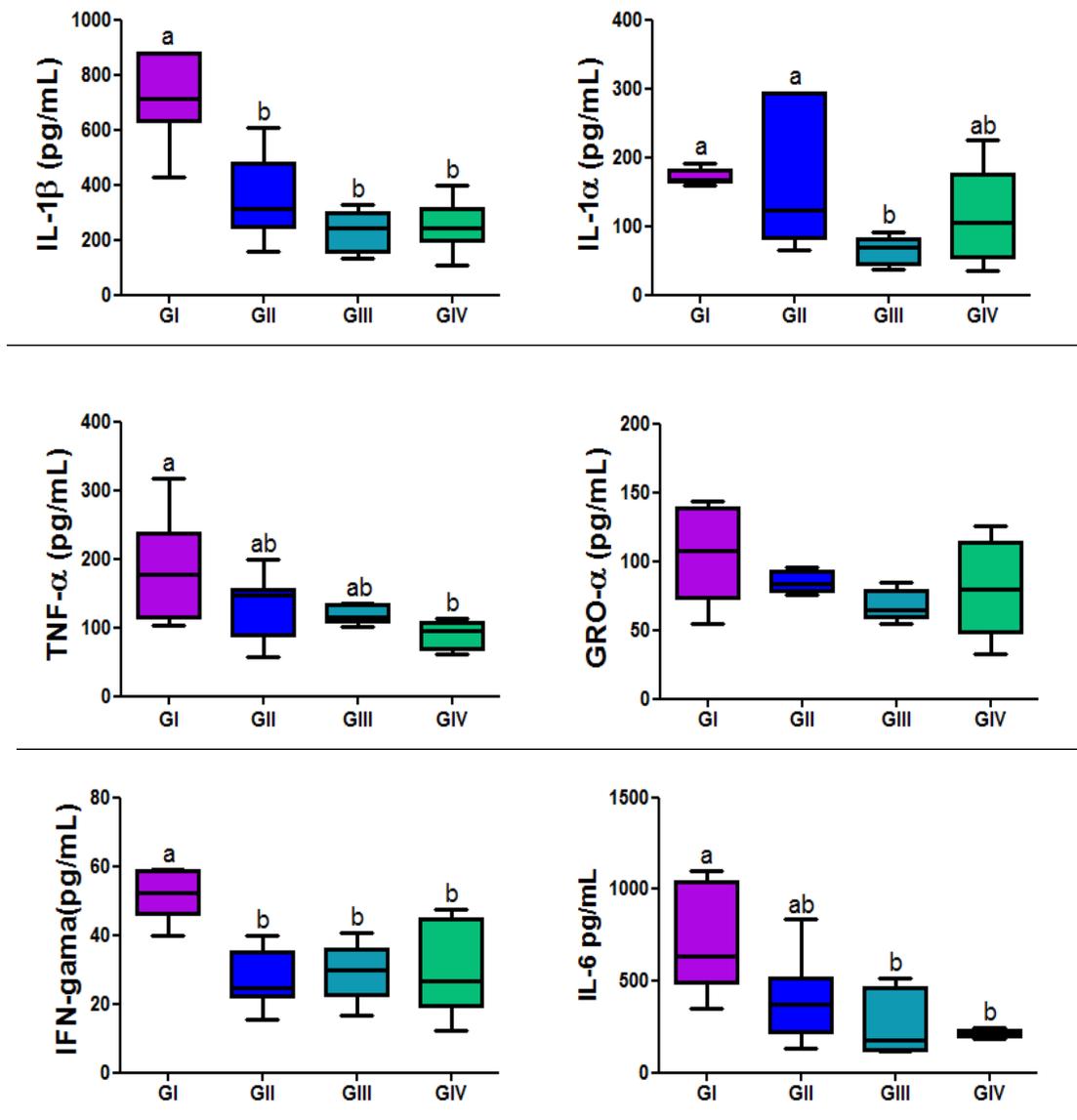


Figura 4. Quantificação de citocinas inflamatórias do tecido pulmonar após 7 dias de tratamento com os diferentes tratamentos empregados. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O ester de ácido ftálico foi um dos principais componentes da composição química do material particulado da cana-de-açúcar. Segundo estudo de Meeker *et al.* (2009), a exposição a derivados do ácido ftálico podem gerar efeitos sistêmicos, tais como alergias, rinites, reações asmáticas e toxicidade direta aos pulmões. Numerosos estudos em animais e humanos tem demonstrado que a exposição a ftalatos no período gestacional induz a redução na produção fetal de testosterona gerando anormalidades tais como malformação do epidídimo, vesícula seminal e próstata. Em adultos, os ftalatos estão associados à alteração na qualidade do sêmen e na produção de testosterona. No estudo publicado por Val *et al.* (2013), a composição química do material particulado urbano estudado foi composta em sua maioria por levoglucosano, seguido de ácido esteárico e apenas pequenos traços de ácido ftálico.

Tais resultados vem de encontro aos apontamentos de Arbex *et al.* (2004) e Ribeiro (2008). Não é casual o fato de que inúmeros pacientes no período de colheita da cana-de-açúcar apresentam piora nos sintomas de doenças respiratórias, tais como asma, rinite, bronquite e enfisema. Não raro, indivíduos saudáveis apresentam problemas nas vias aéreas superiores com irritação no nariz e garganta neste mesmo período.

Partículas de material particulado se depositadas nas vias aéreas superiores podem ser removidas por movimentos mucociliares e processos mecânicos como tosse e espirros, enquanto partículas menores $PM_{2.5}$, $PM_{0.1}$ e nanopartículas, as quais representam mais de 50% da composição do PM_{10} , podendo chegar até 94% no material particulado oriundo de biomassa, são componentes mais tóxicos, capazes de ultrapassar os mecanismos de defesa local e se acumular nas paredes dos alvéolos causando inflamação pulmonar ou podendo chegar até a circulação sistêmica (Tao *et al.*, 2003; Arbex *et al.*, 2004; Mazzoli-Rocha *et al.*, 2008). Tais eventos motivam a migração de células de defesa, especialmente macrófagos, e culminam na produção local de citocinas, gerando inflamação nos alvéolos pulmonares (Yang *et al.*, 2013).

No presente estudo não houve alteração nas concentrações de $TNF-\alpha$ quando comparados o grupo I e o controle (grupo III), apenas entre o grupo I e grupo IV. No estudo de Ding *et al.* (2010), após instilação intratraqueal de PM_{10} por três dias consecutivos em

ratos, apresentou aumento significativo na concentração de TNF- α nos tecidos pulmonares. Ou seja, o material particulado da cana-de-açúcar não estimulou a produção de TNF- α quando comparado ao grupo controle, citocina esta responsável pelo processo de apoptose e que influencia no desenvolvimento de câncer e fibrose do tecido pulmonar (Overocker & Pfau, 2012).

Foi observada a presença de polimorfonucleares e macrófagos no tecido pulmonar no grupo exposto ao material particulado no presente estudo, assim como os resultados de Nemmar *et al.* (2007) que, após a administração sistêmica de partículas provenientes da exaustão da fumaça de óleo diesel em camundongos, observaram alteração nos alvéolos pulmonares, com migração de células polimorfonucleares (PMN) e macrófagos. A presença do material particulado gera nos macrófagos a produção de espécies reativas de oxigênio que levam a produção de citocinas, influenciando na produção de linfócitos que estão relacionados a certas doenças do sistema imune tais como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Overocker & Pfau, 2012; Val *et al.*, 2013).

Os nossos resultados também estão de acordo com os de Schaumann *et al.* (2004) que demonstraram que concentrações ambientais relevantes de PM₁₀ induzem a inflamação pulmonar com um influxo seletivo de monócitos. No presente estudo também foram identificados monócitos nos alvéolos pulmonares estudados.

A variação histológica do espaço alveolar no presente estudo foi digna de nota apenas no grupo IV, grupo exposto apenas à infecção por *S. aureus*. No entanto, no estudo de Martin *et al.* (2007), a instilação de partículas de poluição do ar da cidade de Buenos Aires durante 7 dias em camundongos resultou em uma redução do espaço alveolar no pulmão, associado com a infiltração de células, principalmente macrófagos e monócitos.

A análise histopatológica do coração não revelou nenhuma alteração do grupo I em relação aos demais grupos no presente estudo. Tal resultado vai de encontro aos de Nemmar *et al.* (2007) que também não identificaram alterações nos tecidos do coração, fígado e rins após a administração sistêmica de partículas provenientes da exaustão da fumaça de óleo diesel em camundongos.

O afinamento na camada de tecido conjuntivo da traqueia foi observado em relação a medida de centro em todos os grupos em relação ao controle, principalmente na medida do comprimento mais curto (começo da cartilagem hialina até a extremidade das células

caliciformes). Esta constatação corrobora com os dados de Tomkiewicz *et al.* (1995) os quais identificaram alterações morfológicas na traqueia de animais expostos a poluentes atmosféricos.

Está bem estabelecido que a inalação de partículas poluentes pode causar inflamação pulmonar e sistêmica (Mills *et al.*, 2009). Estes efeitos têm sido sugeridos como resultado da liberação de mediadores inflamatórios dos pulmões na circulação sistêmica ou pelos efeitos diretos da produção local de substâncias pró-inflamatórias ou por efeito direto das partículas finas e ultrafinas translocadas (Nemmar *et al.*, 2007; Val *et al.*, 2013). A quantificação de mediadores inflamatórios no presente estudo revelou a produção de citocinas inflamatórias, principalmente pelo grupo I, grupo que recebeu o material particulado exclusivo. Ocorreu uma produção significativa na liberação de IL-1 α , IL-1 β , INF- γ e IL-6 em relação ao grupo controle.

No presente estudo, a produção de IL-6 também foi motivada pelo material particulado da cana-de-açúcar, semelhantes aos estudos realizados com outras fontes de material particulado. Tal resultado vai de encontro ao estudo experimental em ratos, conduzido por Mazzoli-Rocha *et al.* (2008), que mostrou que os efeitos do material particulado oriundo de poluição veicular apresentou os mesmos desfechos respiratórios comparados ao material particulado oriundo da biomassa da cana-de-açúcar.

A associação entre poluição do ar e produção de IL-6 pode estar ligada ao aumento na produção de fibrinogênio no plasma sanguíneo (Ruckerl *et al.* 2007). Assim, o aumento de IL-6 promovido pelo particulado de biomassa da cana-de-açúcar pode agir como indutor na produção de fibrinogênio e agravar casos em pacientes cardiopatas.

A liberação de IL-6 corresponde a uma resposta inflamatória típica, sendo que existem relatos de que a inalação e a instilação de partículas poluentes podem levar a uma diminuição da função pulmonar e uma resposta inflamatória caracterizada principalmente pela liberação de IL-6 (Bateson & Schwartz, 2008; Mazzoli-Rocha *et al.*, 2008). A exposição de células epiteliais pulmonares em cultura à partículas de poluição demonstrou um aumento na liberação de IL-1 β , TNF- α e, principalmente, IL-6 (Totlandsdal *et al.*, 2008). No presente estudo houve uma maior expressão de IL-6 no grupo I comparada ao controle (grupo III) e grupo IV, e maior expressão de IL-1 β comparada a todos demais grupos.

O aumento da expressão de IL-6 e IL-1 β também já foi verificada em culturas primárias de células cardíacas de ratos quando expostos a partículas poluentes do ar e em amostras de sangue de pessoas expostas a quantidades elevadas de partículas de poluição do ar (Tornqvist *et al.*, 2007; Totlandsdal *et al.*, 2008).

Estudo conduzido por Xiao *et al.* (2013) observou que ratos tratados com poluentes do ar, incluindo material particulado, mostraram uma maior produção de IL-6 e TNF- α quando comparados ao grupo controle no primeiro dia após exposição, mostrando seu importante papel como mediador de resposta inflamatória aguda. No nosso estudo a produção de IL-6 também mostrou uma maior expressão quando comparado ao grupo controle, porém não houve diferença estatística entre o grupo I e o controle para produção de TNF- α .

Em estudo realizado por Tesfaigzi *et al.* (2005), ratos expostos a fumaça oriunda de madeira tiveram a produção de INF- γ reduzidos se comparados ao grupo controle. No presente estudo, o grupo I, grupo exposto ao particulado da cana-de-açúcar, apresentou uma expressão mais elevada de INF- γ quando comparado a todos os demais grupos.

No presente estudo, a combinação de exposição ao material particulado mais instilação de *S. aureus* não mostrou mais virulenta em relação à análise histológica do pulmão, tampouco da traqueia ou mesmo motivou a produção de citocinas quando comparado ao grupo I, grupo IV ou grupo controle. Contudo, no estudo de Migliaccio *et al.* (2013) foi verificado que, após exposição de ratos ao material particulado, e posterior inoculação de *Streptococcus pneumoniae*, a bactéria mostrou-se mais virulenta no grupo exposto ao poluente quando comparado ao grupo controle devido a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais alteram a função dos macrófagos e suprimem a ação de linfócitos, favorecendo portanto, mecanismos de infecção.

Com base nos dados aqui publicados, fica claro que são necessários esforços por parte do poder público no intuito de abolir as práticas de queima da palha da cana-de-açúcar previamente a sua colheita. Outros estudos, complementares a este, devem ser realizados no intuito de reafirmar os resultados aqui apresentados.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o material particulado oriundo da biomassa de cana-de-açúcar tem como substância predominante o Ester de ácido ftálico e gera efeitos adversos ao aparelho respiratório de ratos machos *Wistar* motivando a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ quando comparado ao grupo controle. Uma resposta inflamatória diferenciada entre os grupos I e IV foi observada, mostrando que ambos os grupos motivaram a produção de fatores inflamatórios, porém se diferenciando, especialmente pela produção de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ pelo grupo I. A análise morfométrica da traqueia (comprimento mais curto) revelou alteração na medida de centro de todos os grupos em relação ao controle.

REFERÊNCIAS

- Arbex MA, Cançado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2004; 30(2): 158-175.
- Barbosa CMG, Terra-Filho M, Albuquerque ALP, Giorgi D, Grupi C, Negrão CE *et al.* Burnt Sugarcane Haversting – Cardiovascular Effects on a Group of Healthy Workers, Brazil. *Plos on*, 2012; 7 (9), september 1-10.
- Bateson TF, Schwartz J. Children's response to air pollutants. *J Toxicol Environ Health A*. 2008; 71:238–43.
- Becker S, Soukup JM. Exposure to urban air particles alters the macrophage-mediate inflammatory response to respiratory viral infection. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1999; Part A, 57: 445-457.
- Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp. Lung Res*. 2003; 29 (1): 29–44.
- Brauer, M. Health impacts of biomass air In: *HEALTH GUIDELINES FOR VEGETATION FIRE EVENTS*, Lima, Peru, 1998. Geneva, WHO, 1999; 186-220. (Background papers).
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002; 360: 1233–1242.
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 146:180-188.
- Danielsen PH, Loft S, Jacobsen NR, Jensen KA, Autrup H, Ravanat JL *et al.* Oxidative Stress, Inflammation and DNA Damage in Rats After Intratracheal Instillation or Oral Exposure to Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter. *Toxicological Science* 2010; 118(2): 574-585.
- De Kwaadsteniet M, Doeschate KT, Dicks LM. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48(1):65-70.
- Ding L, Wang K, Shen H, Comier S. Airborne fine particle matter induced pulmonary inflammation as well as oxidative stress in neonate rats. *Chinese Medical Journal*. 2010; 20: 2895-2900.
- Doll R. Atmospheric pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect*. 1978; 22:23–31.

- Donaldson K, Stone V, Seaton A, Macnee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect.* 2001; 109, Suppl 4: 523–527.
- Freitas C, Bremner SA, Gouveia N, Pereira LAA, Saldiva PHN. Internações e óbitos e sua relação com a poluição atmosférica em São Paulo, 1993 a 1997. *Rev Saúde Pública.* 2004; 38(6): 751-757.
- Foltinova J, Schrott-Fischer A, Zilinek V, Foltin V, Freysinger W. Is the trachea a marker of the type of environmental pollution? *Laryngoscope.* 2002; Apr;112(4):713-20.
- Golomb E, Matza D, Cummings CA, Schwalb H, Kodavanti UP, Schneider A *et al.* Myocardial mitochondrial injury induced by pulmonary exposure to particulate matter in rats. *Toxicol Pathol.* 2012; jul 40(5): 779-88.
- Gomes MAM, Neto MCM, Bispo IGA. Interleucina-6, moléculas de adesão intercelular-1 e microalbuminúria na avaliação da lesão endotelial. *Rev SOCERJ.* 2009; 22(6): 398-403.
- Gulisano M, Pacini P, Marceddu S, Orlandini GE. Scanning electron microscopic evaluation of the alterations induced by polluted air in the rabbit bronchial epithelium. *Anat Anz.* 1995; 177:125–131.
- Harkema JR, Hopper CG, Hyde DM, St George JA, Wilson DW, Dungworth DL. Response of macaque bronchiolar epithelium to ambient concentrations of ozone. *Am J Pathol.* 1993; 1143: 857-866.
- Kashima S, Yorifuji T, Tsuda T, Eboshida A. Asian dust and daily all-causes or specific mortality in western Japan. *Occup Environ Med.* 2012; Oct 19: 908-915.
- Kodavanti UP, Schladweiler MCJ, Ledbetter AD; Hauser R, Christiani DC, Samet JM, *et al.* Pulmonary and systemic effects of zinco-containing emission particles in three rat strains: Multiple exposure scenarios. *Toxicological Science.* 2002; 70: 73-85.
- Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R *et al.* Inhaled environment combustion particles cause myocardial injury in the wistar kyoto rats. *Toxicological science.* 2003; 71: 237-245.
- Kodavanti UP, Schladweiler MC, Gilmour PS, Wallenborn JG, Mandavilli BS, Ledbetter AD *et al.* *Environ Health Perspect.* 2008; Jan 116(1): 13-20.

- Koenig JQ, Larson TV, Hanley QS, Rebolledo V, Dumler K, Checkoway H *et al.* Pulmonary function changes in children associated with fine particulate matter. *Environ. Res.* 1993; 62, 22–38.
- Levesque S, Taetzsch T, Lull ME, Kodavanti U, Stadler K, Wagner A *et al.* Diesel exhaust activates and primes microglia: Air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives.* 2011; 119: 1149-1155.
- Logan WPD. Mortality in London fog incident, 1952. *Lancet.* 1953; 1:336-8.
- Lui C, Ying Z, Harkema J, Sun Q, Rajagopalan S. Epidemiological and experimental links between air pollution and type 2 diabetes. *Toxicol Pathol.* 2013; Feb 41(2): 361-373.
- Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environ Res.* 2007; 105(3):340-9.
- Mauderly JL. Lung overload: the dilemma and opportunities for resolution. *Inhal. Toxicol.* 1996; 8 (suppl): 1-28.
- Mazzoli-Rocha F, Magalhães CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res.* 2008; 108(1): 35-41.
- Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2009; 364: 2097-2113.
- Migliaccio CT, Kobos E, King KO, Porter V, Jessop F, Ward T. Adverse effects of wood smoke PM (2,5) on macrophage function. *Inhal Toxicol.* 2013; 25(2): 67-76.
- Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, Macnee W, Cassee FR *et al.* Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc.* 2009; Med, 6: 36–44.
- Miller KA, Siccovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL *et al.* Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *New England Journal of Medicine.* 2007; vol.356(5): 447-458,.
- Miyata R, Bai N, Vincent R, Sin DD, Van Eeden SF. Statins reduces ambient particulate matter-induced lung inflammation by promoting the clearance of PM10 from lung tissues. *Chest.* 2013; Feb 1; 143(2): 452-60.

- Mogan TE, Davis DA, Iwata N, Tanner JA, Snyder D, Ning Z *et al.* Glutamatergic neurons in rodent models respond to nanoscale particulate urban air pollutant *in Vivo* and *in Vitro*. *Environmental Health Perspective*. 2011; 119(7): 1003-1009.
- Nemmar A, AL-Maskari S, Ali BH, AL-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(3): 664-70.
- Overocker J, Pfau JC. Cytokine production modified by system X(c) after PM10 and asbestos exposure. *J Young Investig*. 2012; 23(6): 34-39.
- Peters A, von Klot S, Heier M, Trentinaglia I, Hormann A, Wichmann HE *et al.* Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1721–1730.
- Poma A, Limongi T, Pisan C, Granato V, Picozzi P. Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. *Toxicol. 2006; In Vitro (6)*, 1023–1029.
- Pope CA, Bates DV, Raizenne ME. Health-effects of particulate air-pollution-time for reassessment. *Environ Health Perspect*. 1995; 103: 472-480.
- Ribeiro H. Queimadas de Cana-de-Açúcar no Brasil: Efeitos à Saúde Respiratória. *Rev Saúde Pública*. 2008; 42(2): 370-6.
- Rodrigues R. Análise morfológica do epitélio respiratório e avaliação radiológica do trato respiratório de cobaias (*Cavia porcellus*) mantidas sobre diferentes sistemas de ventilação. Dissertação apresentada a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- Ruckerl R, Ibaldo-Mulli A, Koenig W, Schneider A, Woelke G, Cyrys J *et al.* A. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 432–441.
- Ruckerl R, Greven S, Ljungman P, Aalto P, Antoniadou C, Bellander T *et al.* Air Pollution and Inflammation (Interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in Myocardial Infarction Survivors. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115 (7): 1072-80.
- Samet JM, Dominici F, Currier FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987–1994. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1742–1749.

- Schaumann F, Borm PJ, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RP et al. Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 898–903.
- Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Tucson. *Epidemiology.* 1997; 8: 371–377.
- Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight US counties. *Epidemiology.* 1999; 10: 17–22.
- Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 1995; 345:176-178.
- Silbajoris R, Osornio-Vargas AR, Simmons SO, Reed W, Bromberg PA, Dailey L.A et al. Ambient Particulate Matter Induces Interleukin-8 Expression through an Alternative NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) Mechanism in Human Airway Epithelial Cells. *Environmental Health Perspective.* 2011; 119(10): 1379-1383.
- Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35:327–40.
- Tesfaigzi Y, McDonald JD, Reed MD, Singh SP, Sanctis GT, Eynott PR et al. Low-level subchronic exposure to wood smoke exacerbates inflammatory responses in allergic rats. *Toxicological Sciences.* 2005; 88(2): 505-513;.
- Tomkiewicz RP, Albers GM, De Sanctis GT, Ramirez OE, King M, Rubin BK. Species differences in the physical and transport properties of airway secretions. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995; 73(2): 165-71.
- Tornqvist H, Mills NL, Gonzales M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL et al. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 395–400.
- Totlandsdal AI, Skomedal T, Lag M, Osnes JB, Refsnes M. Pro-inflammatory potential of ultrafine particles in mono- and co-cultures of primary cardiac cells. *Toxicology.* 2008; 247: 23–32.
- Totlandsdal AI, Refsnes M, Skomedal T, Osnes JB, Schwarze PE, Lag M. Particle-induced cytokine responses in cardiac cell cultures--the effect of particles versus soluble mediators released by particle-exposed lung cells. *Toxicol Sci.* 2008; 106(1): 233-41.

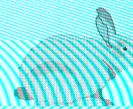
- Tremlová J, Szakova J, Sysalova J, Tlustos P. Bioavailability of arsenic, cadmium, iron and zinc in leafy vegetables amended with urban particulate matter suspension. *J Sci Food Agric.* 2013; 93(6): 1378-1384.
- Val S, Liousse C, Doumbia EH, Galy-Lacaux C, Cachier H, Marchand M et al. Physico-chemical characterization of African urban aerosols (Bamako in Mali and Dakar in Senegal) and their toxic effects in human bronchial epithelial cells: Description of a worrying situation. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10(1):1-16.
- Van Berlo D, Hullmann M, Schins RP. Toxicology of ambient particulate matter. *EXS* 2012; 101:165-217.
- van Eeden S F, Tan W C, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 826–830.
- WHO. World Health Organization. Effects of air pollution on children's health and development. A review of the evidence. European Centre for Environment and Health – Bonn Office, 2005.
- Williams ML. Patterns of Air Pollution in Developed Countries. In: Holgate S, Koren H, Samet J, Maynard R. *Air Pollution and Health.* Edited by Elsevier, 1999.
- Wu S, Deng F, Huang J, Wang H, Shima M, Wang X et al. Blood pressure changes and chemical constituents of particulate air pollution: Results from the healthy volunteer natural relocation study. *Environ Health Perspect.* 2013; 121 (1): 66-72.
- Xiao C, Li S, Zhou W, Shang D, Zhao S, Zhu X et al. The Effects of Air Pollutants on the Microecology of the Respiratory Tracts of Rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; May 2, 36(2): 588-594.
- Yang JY, Kim JY, Jang JY, Lee GW, Kim SH, Shin DC et al. Exposure and Toxicity Assessment of Ultrafine Particles from Nearby Traffic in Urban Air in Seoul, Korea. *Environmental Health and Toxicology.* 2013; 28: 1-9.
- Yoshida S, Takano H, Nishikawa M, Miao H, Ichinose T. Effects of Fetal Exposure to Urban Particulate Matter on the Immune System of Male Mouse Offspring. *Biol Pharma Bull.* 2012; 35(8): 1238-1243.

Zancul A. O efeito da queimada de cana-de-açúcar na qualidade do ar da região de Araraquara. Dissertação de mestrado da Escola de Engenharia de São Carlos da USP, São Carlos, 1998.

Zhang J, Smith KR. Household Air Pollution from Coal and Biomass Fuels in China: Measurements, Health Impacts and Interventions. *Environmental Health Perspectives*. 2007; vol 115 (6): jun.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1405-1, sobre "Estudo epidemiológico-experimental dos efeitos do material particulado proveniente da combustão da biomassa da palha da cana-de-açúcar sobre a saúde humana e animal", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antônio Carlos Pereira / Telmo Oliveira Bittar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 29 de novembro de 2007.

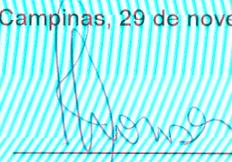
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1405-1, entitled "Epidemiological and experimental study of particulate matter hazard from sugar cane biomass combustion over human and animal health", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 29, 2007.

Campinas, 29 de novembro de 2007.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>