



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação do comprometimento hepático na exposição à micropartículas poluentes (MP); estudo da expressão de RNA

Alexandre Morais Carneiro

Salvador (Bahia)
Fevereiro, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Carneiro, Alexandre Morais

C289 Avaliação do comprometimento hepático na exposição à micropartículas poluentes (MP): estudo da expressão RNA / Alexandre Morais Carneiro. Salvador: AM, Carneiro, 2014.

VIII; 40 fls.: il. [tab., fig.].

Inclui anexos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Ribeiro de Freitas.

Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.

1. Material particulado. 2. Fígado gorduroso. 3. Estresse oxidativo. I. Freitas, Juliana Ribeiro. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.36



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação do comprometimento hepático na exposição à micropartículas poluentes (MP); estudo da expressão de RNA

Alexandre Morais Carneiro

Professora orientadora: **Juliana Ribeiro de Freitas**
Coorientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2013.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Fevereiro, 2014

Monografia: *Avaliação do comprometimento hepático na exposição à micropartículas poluentes (MP): estudo da expressão de RNA*, de **Alexandre Moraes Carneiro**.

Professora orientadora: **Juliana Ribeiro de Freitas**
Coorientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**

COMISSÃO REVISORA:

- **Juliana Ribeiro de Freitas** (Presidente), Professora Assistente do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia
- **Helma Pinchemel Cotrim**, Professora Associada IV do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico (DEPMD) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.
- **Gilberto Cafezeiro Bomfim**, Professor do Departamento de Biologia Geral (DBG) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.
- **Ana Gabriela Alvares Travassos**, Doutoranda do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Medicina e Saúde (PPgMS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VI Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2014.

"A patologia é a fisiologia com barreiras"
(Rudolf Ludwig Karl Virchow)

À minha Família e aos Amigos

EQUIPE

- Alexandre Morais Carneiro, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Endereço para contato: Rua Pacífico Pereira, 159 Apto. 504-B bairro Garcia – 40100-170 Salvador, Bahia, Brasil. Correio-e: alexcarneiro01@hotmail.com;
- Juliana Ribeiro de Freitas, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: julifreitas@yahoo.com.br;
- Niara de Jesus Almeida, Fiocruz/BA;
- Beatriz Rocha Simões Dias, Fiocruz/BA

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

- Laboratório de Patologia e Biointervenção

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. CNPq- Edital 15;
2. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ Fiocruz - BA;
3. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
4. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora orientadora, **Juliana Ribeiro de Freitas**, pela oportunidade de ser seu orientando na iniciação científica e pela paciência, dedicação e compromisso com a realização da minha monografia.
- ◆ Ao meu coorientador, **Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**, por todos os momentos de aprendizado e pela atenção durante o curso da iniciação científica.
- ◆ À **Beatriz Rocha Simões Dias, Niara de Jesus Almeida e Carlos Eduardo Sampaio Guedes** pela paciência e dedicação ao me ajudarem na realização dos experimentos conduzidos nesse trabalho.
- ◆ À **Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras e Antônio Petersen** pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	2
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	3
I. RESUMO	5
II. OBJETIVOS	7
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
III.1. A doença gordurosa não alcoólica do fígado	8
III.2. O papel das micropartículas poluentes no organismo	11
III.3. As micropartículas poluentes e o fígado	13
IV. METODOLOGIA	15
IV.1. Animais	15
IV.2. Exposição à MP	15
IV.3. Eutanásia	16
IV.4. Avaliação do comprometimento hepático	16
IV.4.1. Avaliação anátomopatológica	16
IV.4.2. Extração do RNA	17
IV.4.3. Síntese do cDNA	17
IV.4.4. PCR teste	17
IV.4.5. Síntese da <i>standard curve</i>	18
IV.4.6. Amplificação dos genes pela PCR	18
IV.5. Análise estatística	19
V. RESULTADOS	20
V.1. Glicemia e peso	20
V.2. Perfil bioquímico	22
V.3. Avaliação anatomopatológica	23
V.4. Expressão de colágeno 1A	24
V.5. Expressão de TNF α	27
VI. DISCUSSÃO	29
VII. CONCLUSÕES	32
VIII. SUMMARY	33
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
X. ANEXOS	
•ANEXO I: Parecer da comissão de ética no uso de animais (CEUA/Fiocruz)	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DGNA	Doença gordurosa não alcoólica do fígado
MP	Micropartículas poluentes
MP2,5	Micropartículas com diâmetro menor que 2,5 μm
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator transformador do crescimento beta
IL-6	Interleucina 6
HDL	Lipoproteína de alta densidade
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
CHC	Carcinoma hepatocelular

ÍNDICE DE TABELA E FIGURAS

TABELA

Tabela 1: Composição da ração hipercalórica D12330.	15
--	----

FIGURAS

Figura 1A: Peso dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	20
Figura 1B: Glicemia dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	20
Figura 2: Peso dos camundongos após exposição.	21
Figura 3: Glicemia dos camundongos após exposição.	21
Figura 4: Glicemia dos grupos magro e obeso após exposição.	21
Figura 5A: Níveis de triglicerídeos dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	22
Figura 5B: Níveis de colesterol dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	22
Figura 6A: Níveis de AST dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	23
Figura 6B: Níveis de ALT dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas.	23
Figura 7: Comparação entre os níveis de ALT dos camundongos magros expostos e não-expostos.	23
Figura 8: Avaliação semi-quantitativa da esteatose (A) e da balonização hepatocelular (B).	24
Figura 9: Avaliação semi-quantitativa da inflamação (A) e da fibrose hepáticas (B).	24
Figura 10: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro não exposto e obeso não exposto.	25
Figura 11: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro exposto e obeso exposto.	25

Figura 12: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro não exposto e magro exposto. 26

Figura 13: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos obeso não exposto e obeso exposto. 26

Figura 14: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro não exposto e obeso não exposto. 26

Figura 15: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro exposto e obeso exposto. 27

Figura 16: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro não exposto e magro exposto. 27

Figura 17: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos obeso não exposto e obeso exposto. 28

I. RESUMO

Introdução: a doença gordurosa não alcoólica do fígado (DGNA) é a doença hepática mais comum no mundo ocidental. Trata-se de uma doença espectral, que pode evoluir de uma esteatose hepática simples para esteato-hepatite não alcoólica, culminando em cirrose. Um dos fatores que parece ser responsável pela progressão dessa doença é a elevação do estresse oxidativo hepático. O estresse oxidativo eleva-se nas células do organismo em resposta a diversos fatores endógenos e exógenos, incluindo a exposição à poluição ambiental. Com o crescente número de pessoas vivendo em ambientes urbanos, onde a poluição ambiental atinge as maiores concentrações, cresce também o interesse pelos efeitos dessa exposição nas doenças hepáticas, em especial a DGNA. Objetivos: estudar em camundongos o efeito da inalação de micropartículas poluentes (MP) derivadas da poluição ambiental, e determinar se essa exposição determina o aumento da expressão de genes relacionados à inflamação e fibrose no fígado. Metodologia: estudo experimental no qual camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta regular do biotério (grupo magro) ou hipercalórica (grupo obeso) para indução de esteatose, e expostos à micropartículas poluentes concentradas ou ao ar limpo. O comprometimento hepático foi determinado por meio da avaliação bioquímica no sangue, pelo estudo anatomopatológico e pela análise da expressão de RNA para fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e colágeno 1A. Resultados: os camundongos alimentados com a dieta hipercalórica ganharam mais peso ($p < 0,0001$), desenvolveram resistência periférica à insulina ($p < 0,0001$), hipercolesterolemia ($p < 0,0001$) e elevações de ALT ($p < 0,0001$) e AST ($p < 0,005$). A exposição não influenciou o peso nem a glicemia dos grupos obeso e magro. Entretanto, não houve diferença entre os níveis de ALT dos grupos obeso exposto e magro exposto, evidenciando possível influência da exposição como responsável pela aproximação dos valores séricos dessa enzima. A avaliação anatomopatológica qualitativa do fígado dos animais obesos revelou padrão semelhante ao encontrado na doença humana. A exposição à MP não aumentou de forma significativa a expressão de colágeno 1A e fator de necrose tumoral alfa, observando-se diferença apenas entre as expressões de colágeno 1A dos grupo magro e obeso não expostos ($p < 0,005$) Discussão: o modelo animal

utilizado nesse trabalho reproduziu, após 11 meses com a dieta hipercalórica, as características clínicas e laboratoriais da DGNA humana, incluindo obesidade, resistência periférica à insulina, dislipidemia e elevação de transaminases hepáticas. Além disso, a avaliação anatomopatológica evidenciou as mesmas características da DGNA humana nos fígados do grupo obeso. A exposição à MP não afetou o peso, a glicemia, e as transaminases hepáticas tanto nos obesos quanto nos magros. No entanto, a exposição à MP parece exercer efeito lesivo nos hepatócitos, em vista da aproximação dos níveis de ALT nos grupos magro e gordo após inalação das micropartículas. A exposição também não foi determinante para aumentar a expressão dos genes avaliados. Por outro lado, a quantificação da expressão dos genes nas amostras por meio da *standard curve* feita a partir de um pool de amostras de RNA pode não ter sido precisa para diferenças mais sutis e iniciais. Conclusões: a exposição às micropartículas não acelerou o curso da NAFLD nos camundogos, assim como não aumentou significativamente a expressão dos genes de colágeno 1A e TNF α . Palavras chave: Material particulado, Fígado gorduroso e Estresse oxidativo.

II. OBJETIVOS

II.1. Geral

Estudar os efeitos da inalação de micropartículas poluentes (MP) em fígados de camundongos C57BL/6 previamente submetidos a uma dieta hipercalórica.

II.2. Específico

II.2.1. Determinar se a exposição a micropartículas poluentes precipita a ocorrência de esteato-hepatite por meio da expressão de genes relacionados com inflamação e fibrose.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III.1. A doença gordurosa não alcoólica do fígado

A doença gordurosa não alcoólica do fígado (DGNA) é uma das doenças hepáticas mais comuns no mundo. Em diferentes estudos, sua prevalência variou de 20 a 51,4%, dependendo da amostra avaliada, sendo maior também em hispânicos, seguidos de caucasianos e negros (Browning et al., 2004; Bedogni et al., 2005; Lee et al., 2007). Um aspecto importante da DGNA encontra-se no fato desta acometer principalmente indivíduos obesos e portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003; Chalasani et al., 2012). Wanless e Lentz (1990) encontraram esteatose hepática em 70% dos obesos e 35% dos magros em um estudo de autópsias, além de relação entre o grau de obesidade e a severidade da esteatose. Em estudo descritivo realizado no Brasil, Cotrim et al. (2011) observaram grande frequência de DM2, hiperlipidemia e obesidade ou sobrepeso nos indivíduos portadores de DGNA.

A principal característica da DGNA é o acúmulo de triglicerídeos no interior dos hepatócitos. Esse acúmulo é resultado de delicada interação entre diversos elementos, incluindo fatores nutricionais, resistência periférica à insulina e DM2 descontrolada. A resistência periférica à insulina, ao promover lipólise, aumenta os níveis de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, os quais são metabolizados no fígado. Por outro lado, o excesso de carboidratos ingeridos induz lipogênese hepática. Nos hepatócitos, os ácidos graxos são estocados em vesículas sob a forma de triglicerídeos ou são exportados para a corrente sanguínea associados à lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (Brunt et al. Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic. In Burt et al. MacSween's Pathology of The Liver. 6ª ed. Elsevier Ltd; 2012. p. 293-359). Sendo assim, por sua associação com as dislipidemias, o DM2 e a hipertensão arterial, a DGNA é aceita como a expressão hepática da síndrome metabólica (Marchesini et al., 2001). No Brasil, essa relação entre a DGNA, a resistência à insulina, a obesidade e a síndrome metabólica também já foi observada (Rocha et al., 2005).

A DGNA é uma doença espectral, e o encontro de esteatose hepática associada à infiltrado inflamatório, balonização hepatocelular preferencialmente em zona perivenular, corpúsculos de Mallory-Denk, necrose de hepatócitos e fibrose perisinusoidal caracteriza a esteato-hepatite não

alcoólica (NASH) (Yeh & Brunt, 2007). Dessa forma, um portador de DGNA pode ter apenas esteatose hepática ou esteato-hepatite com diferentes graus de inflamação e fibrose, podendo evoluir, culminando no surgimento de cirrose hepática. Tanto a esteatose hepática quanto a NASH são assintomáticas na maioria dos casos. Entretanto, fadiga e dor abdominal no quadrante superior direito podem ser referidas, assim como manifestações de resistência à insulina, incluindo acantose nigricans e síndrome do ovário policístico. Laboratorialmente, a NASH pode determinar elevações nos níveis de aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), além de ser acompanhada também por aumento dos triglicérides, índice de massa corpórea elevado e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Brunt et al. Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic. In Burt et al. MacSween's Pathology of The Liver. 6ª ed. Elsevier Ltd; 2012. p. 293-359).

Na faixa etária pediátrica, a DGNA também é muito prevalente, chegando a afetar quase 10% de uma população de 2 a 19 anos de idade estudada por Schwimmer et al. (2006), sendo mais frequente nos obesos e hispânicos. A DGNA pediátrica possui patogênese similar à do adulto (Giorgio et al., 2013). Entretanto, alguns aspectos morfológicos chamam atenção na patologia da NASH infantil. A predileção da lesão hepatocelular pela zona perivenular não ocorre, assim como o padrão de fibrose perisinusoidal. Na NASH pediátrica, a inflamação e a fibrose predominam nos espaços porta, e balonização hepatocelular possui distribuição azonal (Schwimmer et al., 2005). Apesar disso, Carter-Kent et al. (2009) encontraram um padrão misto de NASH adulta e pediátrica em 82% dos casos de DGNA avaliados em estudo multicêntrico na América do Norte, levantando questionamentos acerca de tal divisão.

A cirrose é uma das principais complicações da NASH, acompanhada do risco elevado para carcinoma hepatocelular (CHC) (Caldwell & Argo, 2010). O desenvolvimento de cirrose é mais frequente nos pacientes com NASH do que nos portadores de esteatose hepática, assim como a frequência de morte por causas hepáticas (Matteoni et al., 1999). A própria síndrome metabólica aumenta o risco de CHC em pacientes portadores de outras doenças hepáticas, como a hepatite C, e a NASH também está associada ao aumento do risco de desenvolvimento desse câncer mesmo na

ausência de cirrose (Michelotti et al., 2013). Além disso, o impacto da NASH é crescente, gerando altos custos para os sistemas de saúde. Agopian et al. (2012) registraram, num período de dez anos, aumento de 16% no número de transplantes hepáticos realizados em pacientes cuja indicação primária foi decorrente da NASH.

Contudo, a evolução da esteatose simples para o quadro de NASH estabelecido ainda está sendo elucidada e muito do que é proposto atualmente é teórico. Por outro lado, alguns aspectos implicados na patogênese da NASH são focos de diversas pesquisas. O estresse oxidativo faz-se presente no decorrer da doença, juntamente com a peroxidação lipídica, o aumento do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e a ativação das células estreladas hepáticas com consequente deposição de colágeno no espaço de Disse (Stärkel et al., 2003). Camundongos com NASH tem a expressão aumentada de Nrf2, fator de transcrição cujos produtos incluem enzimas antioxidantes que respondem ao estresse oxidativo (Xu et al., 2011). Em outro estudo, pacientes obesos com DGNA também expressaram mais enzimas de fase II, responsáveis pela conjugação de metabólitos com grupos polares, em comparação ao grupo controle (Younossi et al., 2005). A β -oxidação mitocondrial desregulada nos hepatócitos, aliada ao grande influxo hepático de ácidos graxos livres observado nos quadro de resistência a insulina, revelou que a lipotoxicidade parece ser um dos grandes mecanismos de progressão da DGNA. Os ácidos graxos livres, assim como os produtos da peroxidação lipídica decorrente do estresse oxidativo, são tóxicos para as células. Dessa forma, o acúmulo intracelular de triglicerídeos pode ser um mecanismo de defesa ao invés do agente lesivo, já que é relativamente inerte nos hepatócitos (Jou et al., 2008). A própria balonização hepatocelular pode representar uma relação entre o acúmulo de produtos lipídicos e a lesão do citoesqueleto na NASH (Caldwell et al., 2010). Além disso, a ativação dos receptores Toll-like 4 das células de Kupffer e das células estreladas por endotoxinas (lipopolissacarídeo) bacterianas, que chegam ao fígado por meio do sangue portal, parece ter importante papel na fibrogênese e na inflamação características da NASH (Rivera et al., 2007; Seki et al., 2007; Ye et al., 2012).

Supõe-se que diversos outros mediadores participem da complexa patogênese da DGNA. Pacientes com DGNA e NASH possuem expressão aumentada e níveis elevados do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e esses níveis se associam à fibrose hepática (Crespo et al., 2001; Hui et al., 2004; Lesmana et al., 2009). Altos níveis de interleucina 6 (IL-6) também já foram observados em ambos os estágios da doença (Kugelmas et al., 2003; Haukeland et al., 2006). Ademais, o TGF- β , importante ativador das células estreladas hepáticas e fator fibrogênico, também está elevado em pacientes com DGNA, assim como os níveis de angiotensina e a expressão da enzima de conversão da angiotensina, revelando possível papel também da hipertensão arterial na fibrose hepática (Dixon et al., 2003; Sookoian et al., 2011). Entretanto, em recente revisão sobre esses mediadores, Braunersreuther et al. (2012) concluíram que os papéis das citocinas e quimocinas na patogênese da DGNA não estão totalmente esclarecidos.

III.2. O papel das micropartículas poluentes no organismo

As micropartículas poluentes são parte da poluição atmosférica e se originam principalmente da queima de combustíveis fósseis, como o diesel e a gasolina, dos incêndios e da poeira de diversas misturas de areia e minerais inorgânicos. Essas partículas podem ser agrupadas de acordo com seu tamanho; MP10 reúne partículas com diâmetros menores que 10 μ m e MP2,5 reúne as partículas com diâmetros menores que 2,5 μ m, sendo esses dois grupos amplamente estudados. MP2,5 contém partículas sólidas e líquidas, como: carbono elementar, carbono orgânico, sulfatos, nitratos, ferro, potássio, zinco e silicone, grande parte derivada da queima de combustíveis fósseis (Haynes, 2010).

A exposição crônica a MP apresenta forte associação com o aumento da morbi-mortalidade cardiovascular geral e por doença coronariana em humanos (Puett et al., 2009), assim como o aumento do risco de morte em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (Sunyer et al., 2000). Em crianças, a exposição à poluição urbana, principalmente a causada pelo tráfego intenso de automóveis, exacerba doenças respiratórias preexistentes, e evidências sugerem associação entre essa exposição e o desenvolvimento de asma (Schwartz, 2004). Além disso, dentre os componentes de MP2,5, os sulfatos e o carbono orgânico, derivados da queima de combustíveis fósseis, são os que

apresentam associação mais forte com o incremento da mortalidade geral, por doenças cardiovasculares, incluindo doença isquêmica do coração, e por doenças pulmonares (Ostro et al., 2010). Entretanto, parece que quanto menor for o diâmetro de MP, mais danos podem ser causados (Araujo et al., 2008).

As micropartículas, ao serem inaladas, podem se depositar nas vias aéreas superiores, na árvore traqueobrônquica ou nos alvéolos. Entretanto, uma parte de MP com diâmetros muito pequenos pode translocar-se para a circulação sistêmica e ser depositada em outros órgãos, incluindo o fígado (Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2002; Nemmar et al., 2004). Por outro lado, MP pode, a partir do seu depósito nos pulmões, aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, evidenciando o papel de MP na indução de atividade inflamatória sistêmica (Kido et al., 2011). Diversos estudos experimentais demonstraram que a exposição a MP possui efeitos sobre células endoteliais, aumentando a expressão de VCAM-1 (Quan et al., 2010) e sobre monócitos-macrófagos, com consequente aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α (van Eeden et al., 2001; Bastonini et al., 2011). Camundongos expostos a MP apresentam exacerbação da aterosclerose (Quan et al., 2010), disfunção vascular (Kampfrath et al., 2011), inflamação do tecido adiposo e aumento da resistência periférica a insulina (Xu et al., 2011). Essa exposição parece exercer também um perfil pró-trombótico através da ativação das plaquetas (Nemmar et al., 2004). Em um estudo que analisou os efeitos da exposição aguda a um episódio de poluição atmosférica decorrente de incêndios florestais, observou-se elevação da contagem de neutrófilos bastonetes no sangue periférico dos habitantes locais, sugerindo estimulação da medula óssea pela exposição a MP (Tan et al., 2000). Outros dados experimentais também reforçam esse papel, já que a exposição a MP eleva a produção de GM-CSF por macrófagos alveolares (van Eeden et al., 2001) e aumenta o recrutamento de monócitos da medula óssea de camundongos (Kampfrath et al., 2011). Contudo, o aumento da proteína C reativa, importante marcador bioquímico de resposta de fase aguda, em resposta a MP, apesar de ter sido observado em um estudo realizado em homens adultos (Peters et al., 2001), ainda carece de evidência epidemiológica conclusiva (Li et al., 2012).

O estresse oxidativo é reconhecido como uma das principais formas de toxicidade produzida pela poluição aérea e pelas micropartículas, resultando em alterações de diversas estruturas biológicas, inflamação e morte celular. Ozônio, MP_{2,5}, óxidos de nitrogênio e metais de transição tem grande potencial oxidante e são capazes de induzir a geração de radicais livres no organismo (Lodovici & Bigagli, 2011). Expostos a MP, macrófagos sofrem com o estresse oxidativo e apresentam perfil pró-apoptótico, contribuindo para a gênese de processos inflamatórios (Hiura et al., 1999). Como resposta de defesa ao aumento de radicais livres, células podem maximizar a expressão de enzimas antioxidantes para reações de fases I, modificadoras, e II, conjugadoras. Macrófagos e células epiteliais expostos a MP expressam maiores níveis de enzimas como glutathione-S-transferase e heme oxigenase 1, através da modulação da atividade de Nrf2, importante fator de transcrição (Li et al., 2004). A elevação dos níveis de óxido nítrico sintase induzível, em resposta ao estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio, também já foi observada, o que parece contribuir para disfunção vascular e agravamento da aterosclerose em modelos murinos (Sun et al., 2005). Entretanto, após contínua agressão e esgotamento dos mecanismos intrínsecos de proteção celular, a atividade das vias de sinalização NF- κ B e JNK/AP-1, responsáveis pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, se elevam (Xiao et al., 2003; Wang et al., 2005; Kleinman et al., 2008).

III.3. As micropartículas poluentes e o fígado

O fígado é um dos órgãos onde as MP podem ser depositadas após inalação (Oberdörster et al., 2002). Dados experimentais já revelaram o aumento do estresse oxidativo hepático após exposição direta à MP (Folkmann et al., 2007). Essas partículas podem ativar vias de sinalização intracelulares por meio do TLR4 das células de Kupffer, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6. Dessa forma, a exposição à MP pode favorecer a inflamação hepática, sendo um fator de agravamento da NASH (Tan et al., 2009).

Recentemente, Zheng et al. (2013) demonstraram que a inalação de MP por camundongos induziu resistência à insulina, promoveu NASH e ativou as vias de sinalização intracelulares NF- κ B e JNK/AP-1, em resposta ao estresse oxidativo. Além disso, houve também ativação dos TLR4, o

que promoveu aumento da transcrição das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-6. Por outro lado, Tomaru et al. (2007) observaram que tal exposição em camundongos previamente obesos e diabéticos aumentou a esteatose, o estresse oxidativo hepático e os níveis séricos ALT e AST, demonstrando que a MP também exerce efeito sobre camundongos com outros fatores de risco para NASH.

Trabalhadores da indústria petroquímica do recôncavo da Bahia, que apresentaram elevações das transaminases hepáticas, foram estudados por Cotrim et al. (1999) para investigar a possibilidade de NASH ocupacional. De todos os trabalhadores com no mínimo cinco anos de exposição às toxinas ambientais avaliados, 20 obtiveram diagnóstico anatomopatológico de NASH, não havendo, porém, outros fatores de risco nem fatores etiológicos de doença hepática crônica. Dos 20 trabalhadores com NASH, 10 foram removidos dos locais de trabalho, os quais apresentaram melhora gradual dos níveis de transaminases hepáticas. Tal exposição ocupacional parece ser um fator de risco independente para NASH nesses trabalhadores (Cotrim et al., 2004). Carvalho et al. (2006) encontraram evidência epidemiológica que aponta essa exposição ocupacional como um dos fatores determinantes das alterações hepáticas encontradas. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alcanos e ácidos carboxílicos como os encontrados nos ambientes das refinarias de petróleo e das indústrias petroquímicas, incluindo as baianas, também compõem a MP_{2,5}, cuja composição química parece influenciar quantitativa e qualitativamente os seus efeitos biológicos (Perrone et al., 2013).

Portanto, a exposição às micropartículas poluentes induz um perfil pró-inflamatório sistêmico no organismo, além de efeitos localizados em órgãos específicos, tornando-se um importante fator de morbi-mortalidade. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos da exposição à MP sobre o fígado sadio e o fígado doente (com esteatose). A patogênese da NAFLD ainda permanece sem total elucidação, e sendo a exposição à MP um importante fator de risco para o seu agravamento e desenvolvimento da NASH, torna-se importante o entendimento dos efeitos exercidos pela MP no fígado e sua influência no espectro da DGNA.

IV. METODOLOGIA

IV.1. Animais

Camundongos C57BL/6 machos (n=34) foram divididos em dois grupos. Um grupo foi alimentado com a ração habitual do biotério (n=15) e um grupo foi alimentado com ração hipercalórica D12330 (Tabela 1) da empresa *Research Diets*® (n=19) durante 11 meses. A cada dois meses, foi realizada pesagem e dosagem de glicemia de cada animal. A pesagem foi realizada em balança digital e a dosagem de glicemia foi realizada usando gota de sangue da cauda do animal em fita de glicosímetro e leitura da fita em aparelho de glicosímetro.

Tabela 1: composição da ração hipercalórica D12330

Product #	D12330	
	gm%	kcal%
Protein	23.0	16.4
Carbohydrate	35.5	25.5
Fat	35.8	58.0
	Total	100.0
	kcal/gm	5.56
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	228	912
DL-Methionine	2	0
Maltodextrin 10	170	680
Corn Starch	175	700
Sucrose	0	0
Soybean Oil	25	225
Coconut Oil, Hydrogenated	333.5	3001.5
Mineral Mix S10001	40	0
Sodium Bicarbonate	10.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	4	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
Total	1000.1	5558.5

Fonte: Research Diets®. www.researchdiets.com

IV.2. Exposição à MP

Após 11 meses de acompanhamento e dieta diferenciada, os animais foram enviados por avião ao Laboratório de Poluição Ambiental de Faculdade de Medicina da USP em São Paulo/SP, para exposição à MP no concentrador de partículas. Os animais foram então divididos em 4 grupos:

magro exposto (n=7), magro não exposto (n=8), obeso exposto (n=9) e obeso não exposto (n=10). Os magros foram os animais alimentados com dieta regular do biotério e os obesos os animais alimentados com dieta hipercalórica. A exposição às micropartículas foi realizada durante 3 semanas diariamente. A dose máxima de material particulado com PM 2,5 para exposição de cada animal foi de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ em 24h. Diariamente, um grupo de animais foi colocado em câmara fechada no concentrador, onde recebiam, por quatro horas, ar limpo, sem MP, filtrado (filtro HEPA) e o outro grupo foi colocado em câmara para inalar ar poluído com MP. O concentrador de partículas oferece a quantidade máxima de MP sob forma concentrada, a partir de ar poluído coletado do ambiente. Quando não expostos ou na câmara limpa, os animais eram mantidos em caixas no biotério com sistema de filtração de ar.

IV.3. Eutanásia

Após 3 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia. Todos foram anestesiados por via intraperitoneal, sangue foi coletado do plexo braquial e a cavidade abdominal aberta para remoção do fígado, posteriormente pesado. Parte dos fígados foi utilizada para a confecção de lâminas histológicas e fragmentos de cada fígado foram congelados a -80°C para posterior extração de RNA.

IV.4. Avaliação do comprometimento hepático

IV.4.1. Avaliação anatomopatológica:

Os fragmentos de fígado foram fixados em formol a 10% tamponado. Após processamento histológico, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Secções com $3\text{-}5\mu\text{m}$ foram coradas pela hematoxilina-eosina e pelo picro-sirius vermelho para colágeno e lâminas histológicas foram confeccionadas. Foram avaliados e quantificados o grau de esteatose e balonização hepatocelular, intensidade e tipo de inflamação, grau de fibrose hepática e presença de corpúsculos de Mallory-Denk. A esteatose e balonização foram classificadas como 0 (nenhuma), 1 (discreta), 2 (moderada) ou 3 (intensa). A inflamação foi classificada como 0 (ausência de inflamação), 1 (discreta), 2 (moderada) ou 3 (intensa). A fibrose foi classificada como 0 (nenhuma fibrose), 1

(fibrose perisinusoidal discreta), 2 (fibrose perisinusoidal moderada), 3 (septos fibrosos) ou 4 (cirrose).

IV.4.2. Extração do RNA

Amostras de fígado (30mg) dos camundongos dos diferentes grupos foram utilizadas para a extração do RNA total por meio do RNAeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, o RNA de cada amostra foi quantificado utilizando NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific) e armazenado em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.4.3 Síntese da primeira fita (cDNA)

Com intuito de obter cDNA, o RNA total das diferentes amostras foi submetido a uma RT-PCR. Inicialmente, para a etapa de linearização, $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA total de cada amostra foi adicionado em uma solução contendo $9,6\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada e $0,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Oligo dT (Invitrogen), totalizando $13,8\text{ }\mu\text{L}$. A reação foi realizada no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf) por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a síntese da primeira fita do cDNA, foi preparada uma solução contendo: tampão da PCR 1x (Invitrogen); 2mM de MgCl_2 (Invitrogen); 1mM de dNTP (Eppendorf); $2\text{U}/\mu\text{L}$ Rnase OUT (Invitrogen); e $4\text{U}/\mu\text{L}$ de RT (Invitrogen). Em seguida, $6,2\text{ }\mu\text{L}$ da solução foi adicionado aos tubos contendo o RNA linearizado. As amostras foram submetidas a uma reação a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf). Alíquotas contendo o cDNA na concentração de $2\text{ ng}/\mu\text{L}$ foram alocadas em tubos eppendorf livres de DNase e RNase e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.4.4. PCR teste

Com o objetivo de avaliar a integridade do cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras de fígado, uma alíquota de $5\text{ }\mu\text{L}$ do cDNA (10 ng de cDNA), foi submetida a uma PCR. A reação foi realizada em volume final de $25\text{ }\mu\text{L}$ contendo: $200\text{ }\mu\text{M}$ de cada dNTP; $1,25\text{U}$ de Taq DNA polimerase (Fermentas); tampão com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1x e $0,5\text{ }\mu\text{M}$ dos *primers* GAPDH'R e GAPDH'F. A solução foi submetida às seguintes condições: desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3min,

seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 2:30 min e uma etapa de extensão final realizada a 72 °C por 7 min. O produto foi avaliado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

IV.4.5. Síntese da *standard curve*

Com o intuito de quantificar a expressão dos genes, uma *standard curve* foi produzida a partir de um pool de amostras de RNA representativas do grupo obeso exposto. Cinco amostras de 1,5 µg de RNA foram selecionadas ao acaso a partir desse grupo. Para a etapa de linearização, foi preparada uma solução contendo: 7,5 µg de RNA; 1 µL de Oligo dT (Invitrogen); e 5,2 µL água deionada, totalizando um volume final de 10,6 µL. A reação foi realizada no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf) por 10 minutos a 70 °C. Após a incubação, o volume da solução foi pipetado no filtro Microcon® (EMD Millipore Corporation, Billerica, USA) e centrifugado.

Em seguida, a síntese da primeira fita do cDNA foi feita adicionando-se o volume centrifugado a uma solução contendo: PCR 1x (Invitrogen); 2mM de MgCl₂ (Invitrogen); 1mM de dNTP (Eppendorf); 2U/µL Rnase OUT (Invitrogen); e 4U/µL de RT (Invitrogen). A reação foi efetuada no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf) por 2 horas a 42 °C. Ao término da reação, o volume total foi novamente centrifugado utilizando-se o filtro Microcon®. Após a centrifugação, o filtro foi invertido e novamente centrifugado. O volume final foi utilizado para confecção da *standard curve*, realizada partindo-se de uma concentração inicial de 100ng/µL até chegar a 1,024 ng/µL a partir de quatro diluições sucessivas com água deionizada.

IV.4.6. Amplificação dos genes pela PCR

Para detectar e quantificar a expressão dos genes colágeno 1A e TNFα, PCRs quantitativas (qPCR) foram feitas utilizando-se o cDNA obtido a partir da extração do RNA das amostras de fígado dos camundongos. A amplificação foi feita em volumes finais de 20 µL contendo: 10 µL do marcador SYBR® Green PCR Master MIX (AppliedBiosystems, California, USA); 10 ng de cDNA; 4 µL de água deionizada; e 2 nM dos seguintes *primers*: 5'-TTC ACC TAC AGC ACG CTT GTG-3' (colágeno 1A-forward), (R)5'-GAT GAC TGT CTT GCC CCA AGT T-3' (colágeno 1A-reverse), 5'-

CCA ACG CCC TCC TGG CCA AC-3' (TNF α -forward) e 5'-GAG CAC GTA GTC GGG GCA GC-3' (TNF α -reverse). PCRs utilizando os primers: 5'- CGA CTT CAA CAG CAA CTC CAC TC - 3 (GAPDH-forward) e 5'- CAC CCT GTT GCT GAT GCC GTA TTC -3' (GAPDH-reverse), também foram feitas para posterior normalização pelo GAPDH das quantificações obtidas. Foram utilizadas placas de 96 poços para todas as reações, as quais foram realizadas no ABI Prism 7500 (AppliedBiosystems, Foster City, USA). Para cada camundongo e gene de interesse, a reação foi feita em triplicata.

IV.5. Análise estatística

Inicialmente foram construídos bancos de dados utilizando-se o Excel (Microsoft Office), e para as análises estatísticas, foi utilizado o GraphPad Prism. Para a avaliação do peso e das variáveis bioquímicas, foram utilizados o teste-*t* para comparações entre os grupos gordos e magros e o ANOVA quando comparados mais de dois grupos. Para a avaliação estatística da expressão de colágeno 1A e TNF α normalizadas pelas quantificações do GAPDH de cada amostra, foram empregados o teste-*t* ou Mann-Whitney de acordo com o padrão de normalidade da distribuição dos valores.

V. RESULTADOS

V.1. Glicemia e peso

Após 11 meses de dieta hipercalórica, os camundongos C57BL/6 machos ganharam mais peso do que os alimentados com a dieta regular do biotério ($p<0,0001$; figura 1A). Tal aumento de peso foi acompanhado pela elevação da glicemia, cuja média ultrapassou 150mg/dL, valor mínimo que caracteriza a resistência periférica à insulina nessa linhagem ($p<0,0001$; figura 1B).

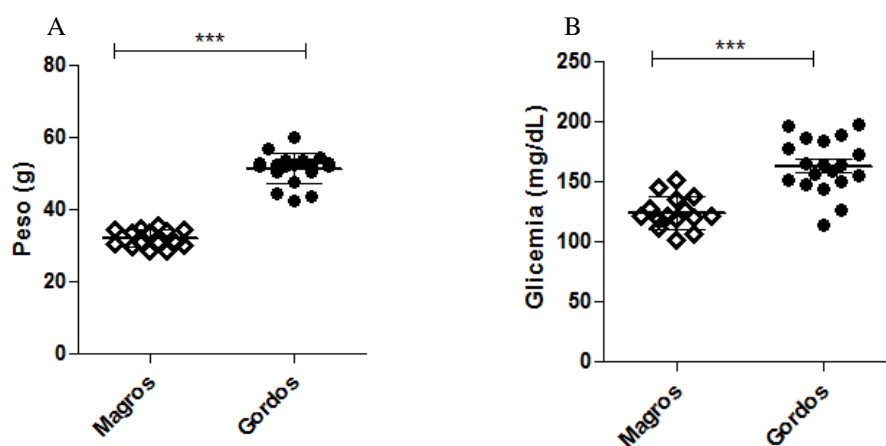


Figura 1: (A) Peso dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. (B) Glicemia dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. *** $p<0,0001$. teste-*t*.

Em seguida às três semanas de exposição, não foram observadas diferenças significativas entre o peso e a glicemia dos camundongos expostos e não-expostos quando comparados internamente nos grupos obeso e magro (Figuras 2 e 3). Por outro lado, comparando-se a glicemia dos grupos obeso e magro após a exposição, observou-se maior glicemia no grupo obeso ($p<0,05$; figura 4). Evidencia-se, contudo, uma tendência de aproximação entre as médias glicêmicas dos grupos obeso e magro após a exposição.

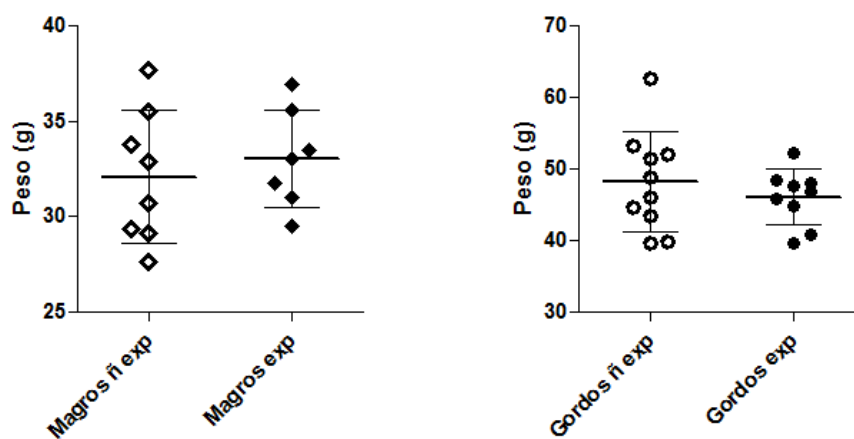


Figura 2: Peso dos camundongos após exposição. ANOVA.

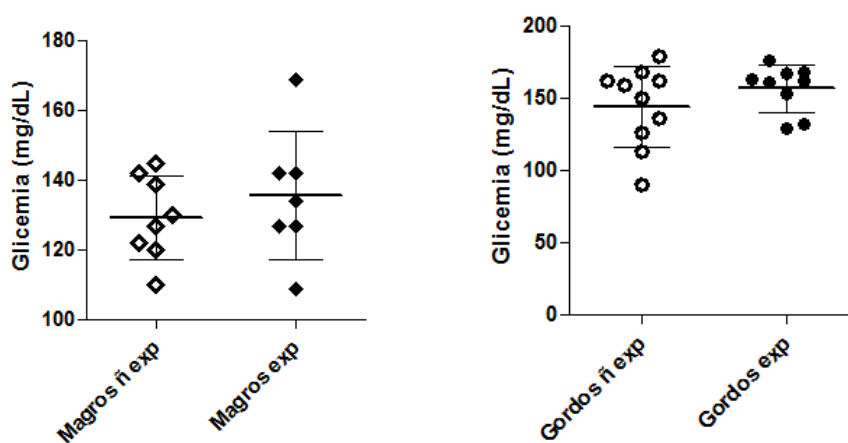


Figura 3: Glicemia dos camundongos após exposição. ANOVA.

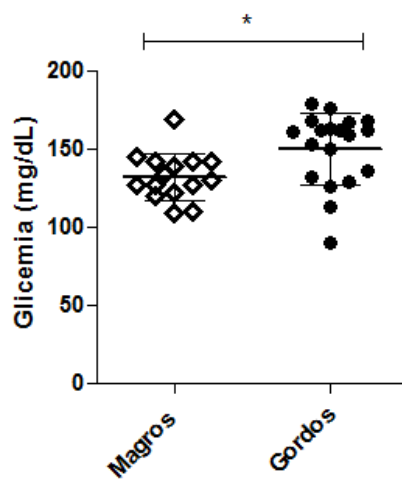


Figura 4: Glicemia dos grupos magro e obeso após exposição. * $p < 0,05$. teste- t .

V.2. Perfil bioquímico

Comparando-se os níveis de colesterol entre os grupos obeso e magro, observou-se níveis mais elevados no grupo obeso ($p < 0,0001$; figura 5B). Entretanto, o mesmo não foi observado na dosagem de triglicérides, que não mostrou diferença significativa (Figura 5A).

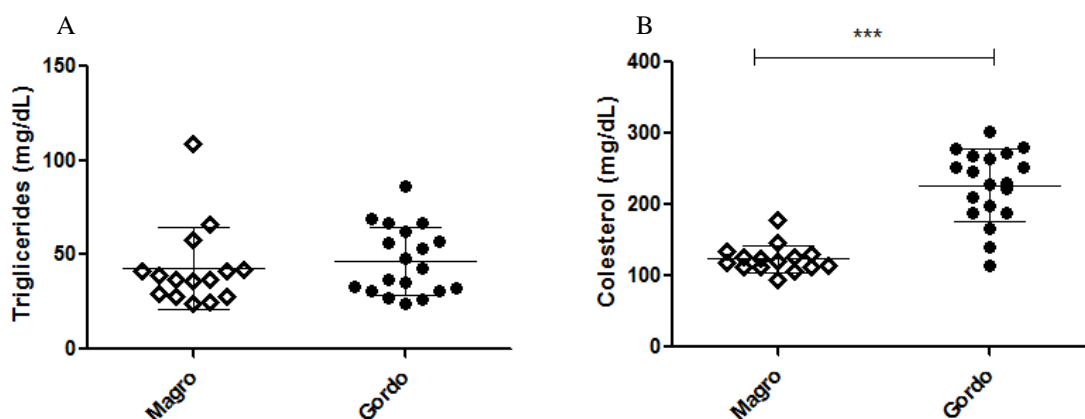


Figura 5: (A) Níveis de triglicérides dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. (B) Níveis de colesterol dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. *** $p < 0,0001$. teste-*t*.

Os valores das transaminases hepáticas também foram mais elevados no grupo obeso, tanto AST ($p < 0,005$; figura 6A) como ALT ($p < 0,0001$; figura 6B) apresentaram aumento significativo após a dieta. Sendo assim, o consumo da dieta hipercalórica por 11 meses reproduziu o perfil bioquímico da DGNA humana nos camundongos C57BL/6, além de induzir obesidade e hiperglicemia.

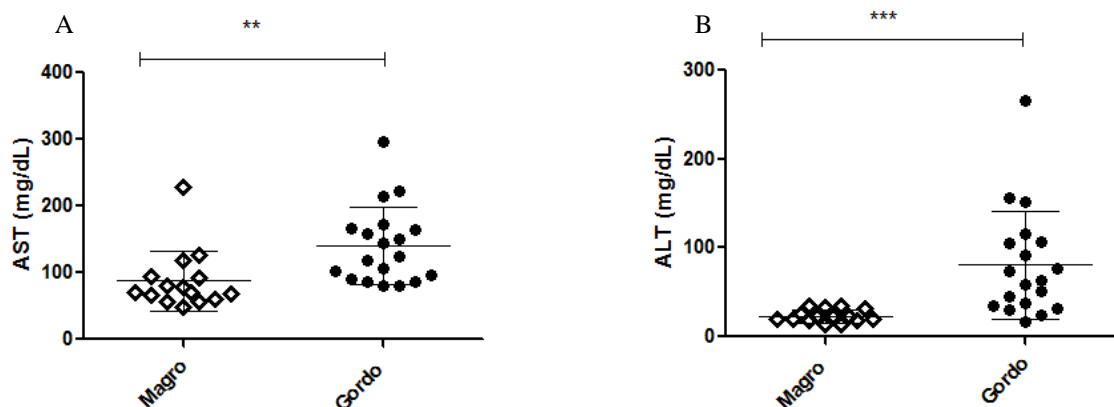


Figura 6: (A) Níveis de AST dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. (B) Níveis de ALT dos grupos magro e obeso após 11 meses com as dietas. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$. teste-*t*.

No entanto, na comparação entre os grupos magro exposto e gordo exposto, não foi encontrada diferença entre as dosagens de ALT ($p > 0,05$; figura 7), mostrando possível papel da exposição como fator de lesão hepática.

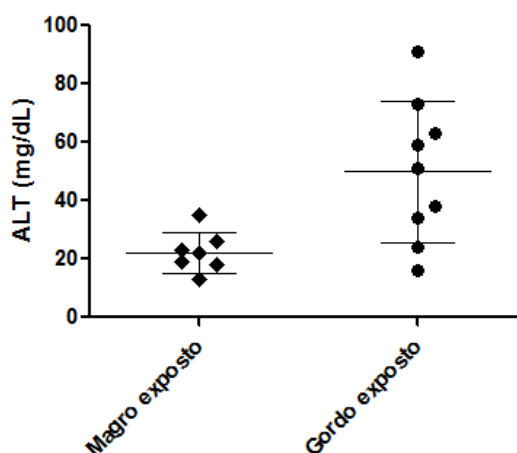


Figura 7: Comparação entre os níveis de ALT dos camundogos magros expostos e obesos expostos. Não houve diferença entre esses dois grupos. ANOVA.

V.3. Avaliação anatomopatológica

A avaliação anatomopatológica semi-quantitativa mostrou que a maioria dos animais obesos desenvolveu esteatose hepática. Por outro lado, nenhum animal magro desenvolveu esteatose (Figura 8A). Da mesma forma, a maioria dos animais obesos desenvolveu balonização hepatocelular, o que não ocorreu nos magros (Figura 8B). Também observou-se inflamação em quase todos os animais

obesos e em parte dos animais magros (Figura 9A). Os animais obesos também desenvolveram mais fibrose do que os magros (Figura 9B). Sendo assim, a dieta hipercalórica também reproduziu o padrão anatomopatológico da NASH humana, com esteatose, balonização hepatocelular, inflamação e fibrose.

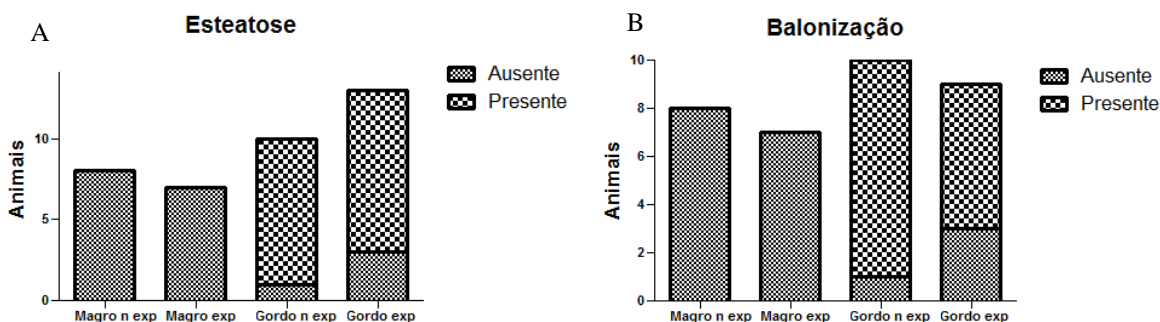


Figura 8: Avaliação semi-quantitativa da esteatose (A) e da balonização hepatocelular (B). Os animais alimentados com a dieta hipercalórica desenvolveram mais esteatose e balonização do que os magros.

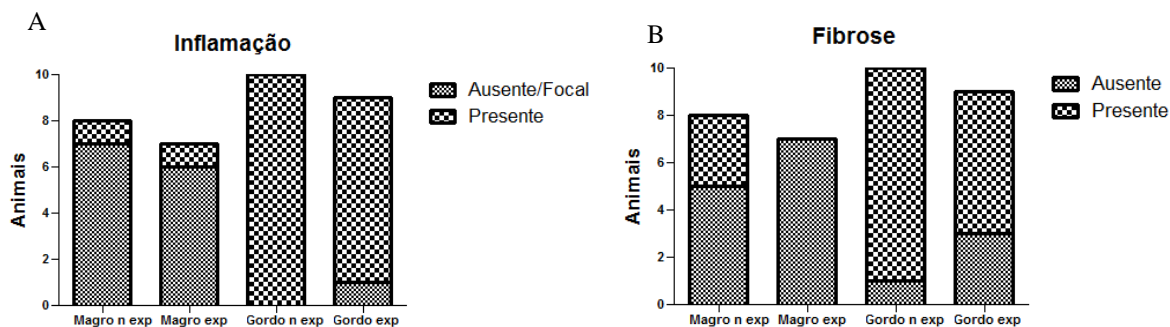


Figura 9: Avaliação semi-quantitativa da inflamação (A) e da fibrose hepáticas (B). Os animais alimentados com a dieta hipercalórica desenvolveram mais inflamação e fibrose do que os magros.

V.4. Expressão de colágeno 1A

Dentre os grupos não expostos, os animais alimentados com a dieta hipercalórica expressaram mais colágeno 1A do que os alimentados com a dieta regular do biotério ($p < 0,005$; figura 10). Entretanto, a mesma diferença não foi obtida comparando-se os dados dos grupos expostos (Figura 11). Tal dado, pode ser um indicativo do papel da exposição como o fator indutor de fibrose hepática, determinando aproximação entre os valores das expressões de colágeno 1A

dos grupos magro e obeso. Por outro lado, comparando-se o efeito exercido pela exposição internamente nos grupos magro e gordo, diferenças significantes não foram observadas (Figuras 12 e 13).

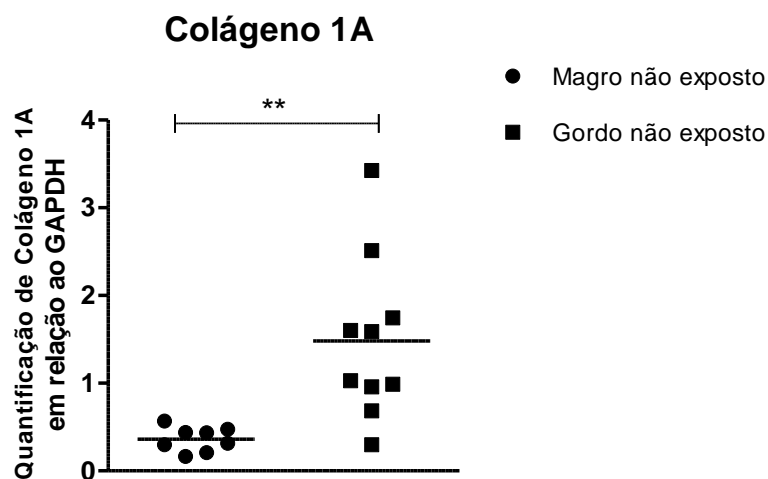


Figura 10: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro não exposto e obeso não exposto. O grupo obeso expressou mais colágeno 1A. $**p < 0,005$ teste-*t*.

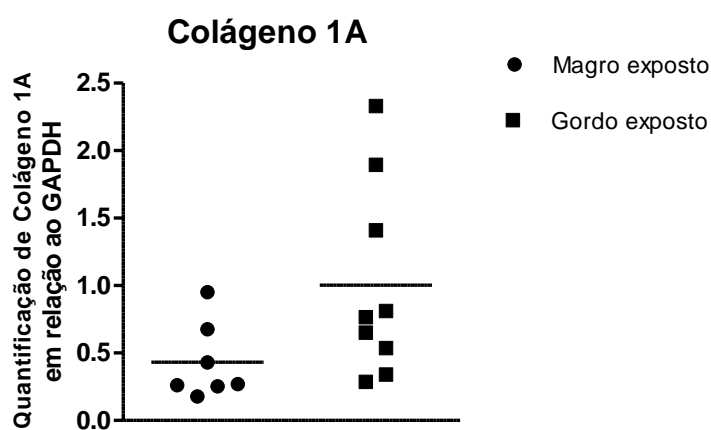


Figura 11: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro exposto e obeso exposto. Não houve diferença significante. teste-*t*.

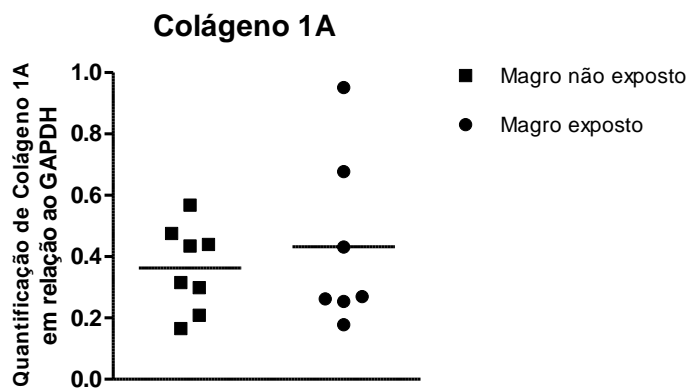


Figura 12: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos magro não exposto e magro exposto. Não houve diferença significativa. teste-*t*.

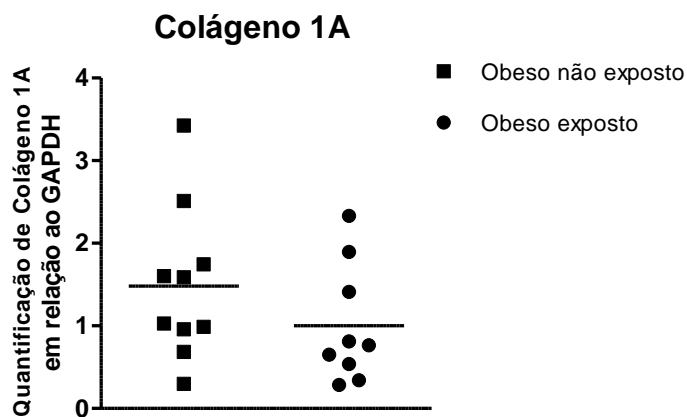


Figura 13: Correlação entre as expressões de colágeno 1A entre os grupos obeso não exposto e obeso exposto. Não houve diferença significativa. teste-*t*.

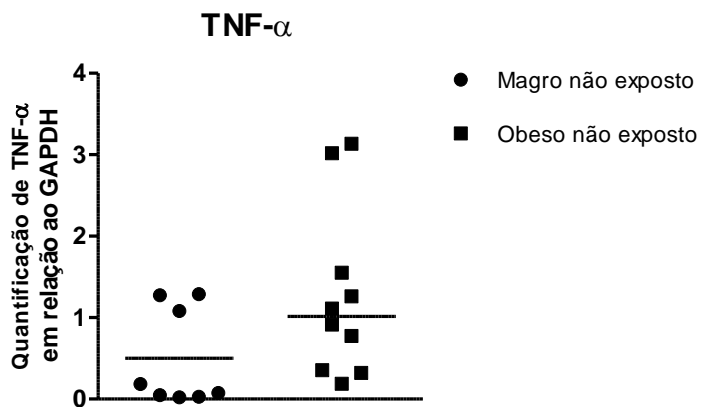


Figura 14: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro não exposto e obeso não exposto. Não houve diferença significativa. Mann-Whitney.

V.5. Expressão de TNF α

Diferentemente da expressão de colágeno 1A, não foram observadas diferenças significantes entre as expressões de TNF α dos grupos magro e obeso não expostos (Figura 14), assim como nos magros e obesos expostos. Dessa forma, o efeito da dieta na expressão de TNF α não foi tão pronunciada. Notam-se apenas leves tendências à maior expressão de TNF α nos grupos obesos, quando comparados aos seus controles magros não expostos (Figura 14) e expostos (Figura 15).

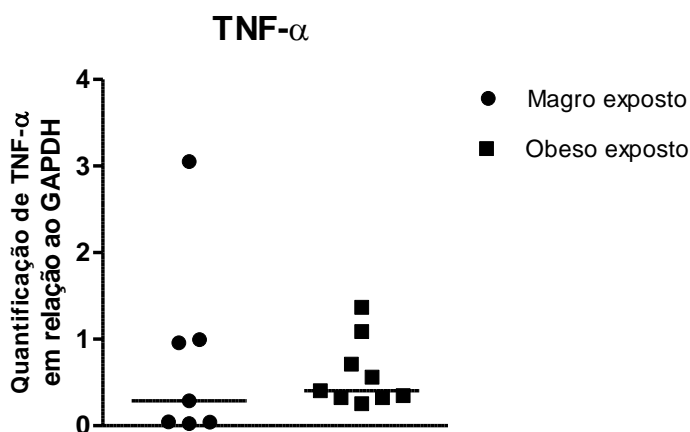


Figura 15: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro exposto e obeso exposto. Não houve diferença significativa. Mann-Whitney.

Além disso, a exposição também não influenciou de forma significativa a expressão de TNF α entre os animais alimentados com a mesma dieta, tanto a regular do biotério (Figura 16), como a hipercalórica (Figura 17).

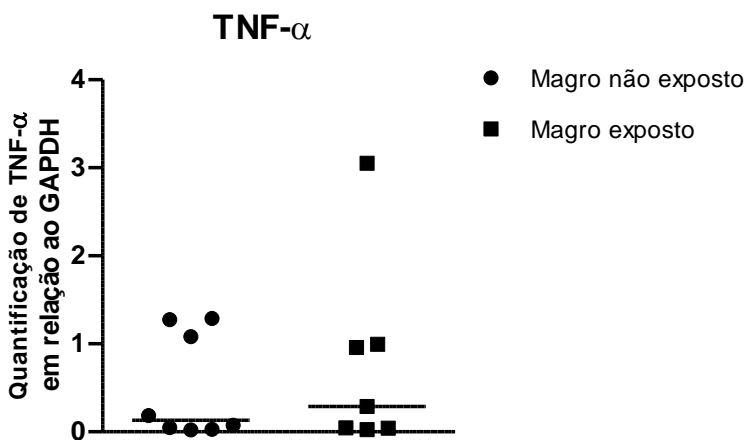


Figura 16: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos magro não exposto e magro exposto. Não houve diferença significativa. Mann-Whitney.

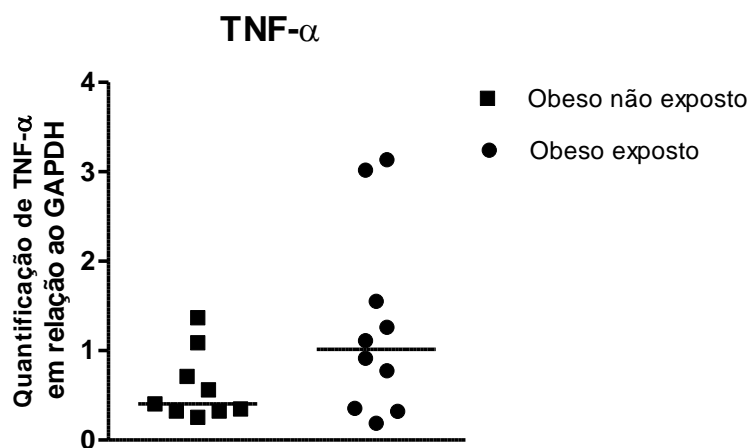


Figura 17: Correlação entre as expressões de TNF α entre os grupos obeso não exposto e obeso exposto. Não houve diferença significativa. Mann-Whitney.

VI. DISCUSSÃO

A avaliação do peso e do perfil bioquímico dos camundongos após os 11 meses de alimentação no biotério revelou que a dieta hipercalórica induziu ganho de peso, resistência periférica à insulina, hipercolesterolemia e aumentos das transaminases hepáticas (ALT e AST). Sendo assim, os camundongos alimentados com a dieta hipercalórica e indutora de esteatose hepática desenvolveram características da Síndrome Metabólica. Entretanto, a exposição não influenciou o peso nem a glicemia dos grupos magro e obeso. Contudo, a análise dos níveis de ALT dos grupos magro exposto e obeso exposto (Figura 7) também não revelou diferença significativa, o que pode indicar um possível papel da exposição como fator de lesão hepática, já que tal enzima reflete ao nível sérico, lesão hepatocelular.

As características anatomopatológicas da NASH classificadas por Yeh e Brunt (2007), incluindo balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose perisinusoidal, também foram encontradas de maneira equivalente à doença humana nos camundongos obesos sem a exposição. Dessa forma, o modelo de indução de esteatose hepática utilizado nesse estudo mostrou-se concordante com a NAFLD humana, validando-o como forma útil para o seu estudo em camundongos.

O estudo da expressão de TNF α nas amostras de fígado avaliada pela qPCR não revelou diferenças significativas entre os grupos expostos e não expostos (Figuras 16 e 17). Além disso, a dieta hipercalórica também não aumentou a expressão de TNF α independente da exposição (Figuras 14 e 15). Tais resultados podem indicar que a exposição à MP dentro dos níveis aceitos pela WHO (World Health Organization 2005) é segura para fígado, utilizando-se como parâmetro a expressão de genes relacionados à inflamação e fibrose. Entretanto, alguns fatores podem ter interferido nos resultados obtidos nas quantificações de TNF α . Primeiramente, a extração de RNA foi feita apenas em secções dos fígados congelados e não no órgão inteiro de cada animal, o que pode ter determinado viés de seleção na amostragem do parênquima hepático. Por outro lado, períodos de exposição mais longos podem ser capazes de determinar diferenças significantes na expressão desse

gene. Zheng et al. (2013) observaram aumento significativo na expressão de TNF α nos fígados de camundongos expostos à MP_{2,5} durante 10 semanas. Também existem formas mais aprimoradas para gerar uma *Standart Curve* capaz de detectar diferenças mais sutis nas quantificações, ao invés da feita a partir de um pool de amostras de RNA extraídas dos fígados congelados. Por ser este um estudo com modelos animais, e não com cultura de células, a grande variância observada nos grupos estudados, e que pode ter afetado a análise estatística, não é inesperada.

Em relação ao gene colágeno 1A, observou-se diferença significativa entre as expressões nos grupos magro não exposto e obeso não exposto (Figura 10). O grupo obeso não exposto expressou mais colágeno 1A, refletindo maior fibrose após consumo da dieta hipercalórica. Tal característica também foi observada na avaliação anatomopatológica das secções de fígado desse grupo. A fibrose, principalmente perisinusoidal, é uma das características da NASH (Yeh & Brunt, 2007). Todavia, a mesma diferença na expressão desse gene não foi observada entre os grupos magro exposto e obeso exposto (Figura 1). Esse fato pode ter acontecido pelo papel de equilíbrio exercido pela exposição, cujo efeito pode ter compensado no grupo magro o efeito fibrogênico evidenciado após o consumo da dieta hipercalórica pelo grupo obeso. Quando comparados isoladamente, a exposição também não aumentou de forma significativa a expressão de colágeno 1A tanto no grupo magro quanto no grupo obeso alimentado com a dieta hipercalórica (Figuras 12 e 13).

Por outro lado, a análise da expressão do colágeno 1A pode ter sofrido influência dos mesmos fatores que foram expostos para o TNF α . Ambos os genes obtiveram um *Threshold Cycle* (Ct) tardio, em oposição ao observado para o GAPDH. Dessa forma, a *Standart Curve* feita a partir do pool de amostras de RNA pode ter sido ineficaz para a quantificação precisa de diferenças menores entre os grupos. Além disso, a utilização de secções do fígado para extrair o RNA também pode ter determinado parcialmente os dados encontrados.

A exposição à MP já é um conhecido indutor de estresse oxidativo (Hiura et al., 1999; Xiao et al., 2003; Li et al., 2004; Wang et al., 2005; Kleinman et al., 2008). Entretanto, analisando-se os resultados obtidos para as expressões de colágeno 1A e TNF α , parece que a exposição a curto prazo

à MP2,5 não acelera o curso da NAFLD e nem precipita a ocorrência de NASH, reconhecida como tendo importante relação com o estresse oxidativo na sua patogênese. Ademais, parece que tal exposição também não induz dano hepático após 3 semanas, independente do grau de esteatose hepática.

VII. CONCLUSÕES

VII.1. A exposição à MP não acelera o curso da NAFLD em camundongos C57BL/6 previamente submetidos à dieta hipercalórica.

VII.2. A exposição de camundongos C57BL/6 à MP por três semanas não aumentou a expressão de colágeno 1A e TNF α .

VIII. SUMMARY

Introduction: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the major hepatic disease in western countries. It has a diverse spectrum of presentations, ranging from hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and can result in end-stage liver disease (cirrhosis). One of the main factors responsible for the progression of this disease seems to be an elevation in hepatic oxidative stress. Oxidative stress increases in response to a great number of endogenous and exogenous factors, including ambient pollution. With the expansion of urban population worldwide, the interest on the effects of ambient pollution in liver disease, especially NALFD, is also increasing.

Objectives: to study the effects of ambient particulate matter in mice and to determine if this exposure raises the expression of genes involved in inflammatory response and fibrosis. Methods: experimental study which evaluated the serum biochemical profile, liver histopathological findings and expression of TNF α and collagen 1A in C57BL/6 mice receiving fatty diet or regular diet, and exposed to ambient particulate matter or filtered air. Results: mice fed with the fatty diet gained more weight ($p < 0,0001$) and developed peripheral insulin resistance ($p < 0,0001$), hypercholesterolemia ($p < 0,0001$) and elevations of serum ALT ($p < 0,0001$) and AST ($p < 0,005$). Histopathological features of liver samples from obese mice revealed the same features of human NAFLD. Exposure didn't enhance the expression of collagen 1A and TNF α independently of the dietary lipid content.

Dicussion: exposure to PM didn't influence weight or glycemia in both dietary groups. Nevertheless, difference in serum ALT levels wasn't observed between obese and lean groups after exposure, showing possible effect of particulate matter inhalation in the approximation of these levels. Exposure to particulate matter didn't affect the expression of the genes studied. Nevertheless, the qPCR analysis using a standard curve made of a RNA pool of samples may not have been effective to quantify smaller differences. Conclusion: exposure to air particulate matter didn't accelerate the progression of NAFLD in mice neither enhanced the expression of collagen 1A and TNF α . Key words: Particulate Matter, Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Oxidative stress.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387–95.
2. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005;42(1):44–52.
3. Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim Y-S, Lee HC, Chung Y-H, Lee YS, Suh D-J. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol*. 2007;47(2):239–44.
4. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37(5):1202–19.
5. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005–23.
6. Wanless I, Lentz J. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990;12(5):1106–1110.
7. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CPMS, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva RDC, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011;10(1):33–7.
8. Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Burt AD. Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, eds. *MacSwee's Pathology of The Liver*. 6th ed. China: Elsevier Limited; 2012:293–359.
9. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N, Ospe- A. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50(8):1844–1850.
10. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet*. 2005;18:365–370.
11. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(5):837–47.
12. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006;118(4):1388–1393.
13. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr*. 2013;13(1):40.

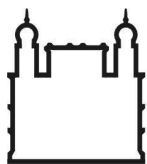
14. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, Lavine JE. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42(3):641–9.
15. Carter-Kent C, Yerian LM, Brunt EM, Angulo P, Kohli R, Ling SC, Xanthakos S a, Whittington PF, Charatcharoenwitthaya P, Yap J, Lopez R, McCullough AJ, Feldstein AE. Nonalcoholic steatohepatitis in children: a multicenter clinicopathological study. *Hepatology*. 2009;50(4):1113–20.
16. Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):162–8.
17. Matteoni C, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu Y, McCullough A. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413–1419.
18. Michelotti G a, Machado M V, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013:1–10.
19. Agopian VG, Kaldas FM, Hong JC, Whittaker M, Holt C, Rana A, Zarrinpar A, Petrowsky H, Farmer D, Yersiz H, Xia V, Hiatt JR, Busuttil RW. Liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: the new epidemic. *Ann Surg*. 2012;256(4):624–33.
20. Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager J-P, Horsmans Y. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol*. 2003;39(4):538–546.
21. Xu W, Shao L, Zhou C, Wang H, Guo J. Upregulation of Nrf2 Expression in Non-Alcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Hepatogastroenterology*. 2011;58(112):2077–80.
22. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Giacco L, Schlauch K, Born TL, Elariny H, Gorreta F, VanMeter A, Younoszai A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42(3):665–74.
23. Jou J, Choi S, Diehl a. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):370–379.
24. Caldwell S, Ikura Y, Dias D, Isomoto K, Yabu A, Moskaluk C, Pramoonjago P, Simmons W, Scraggs H, Rosenbaum N, Wilkinson T, Toms P, Argo CK, Al- AMS, Redick JA. Hepatocellular Ballooning in NASH. *J Hepatol*. 2010;53(4):719–723.
25. Rivera CA, Adegboyega P, Rooijen N Van, Tagalicud A, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2007;47(4):571–579.
26. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner D a, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007;13(11):1324–1332.
27. Ye D, Li F, Lam K, Li H, Jia W, Wang Y, Man K, Lo C, Li X, Xu A. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*. 2012;61(7):1058–1067.

28. Crespo J, Cayón a, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez a, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34(6):1158–63.
29. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46–54.
30. Lesmana CR a, Hasan I, Budihusodo U, Gani R a, Krisnuhoni E, Akbar N, Lesmana L a. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis*. 2009;10(3):201–6.
31. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology*. 2003;38(2):413–419.
32. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen P a, Birkeland K, Bjoro K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol*. 2006;44(6):1167–1174.
33. Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol*. 2003;39(6):967–971.
34. Sookoian S, Gianotti TF, Rosselli MS, Burgueño AL, Pirola CJ, Castaño GO. Liver transcriptional profile of atherosclerosis-related genes in human nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2011;218(2):378–385.
35. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012;18(8):727–35.
36. Haynes R. Particulate soup: identifying the most toxic constituents of PM(2.5). *Environ Health Perspect*. 2010;118(3):A 130.
37. Puett RC, Hart JE, Yanosky JD, Paciorek C, Schwartz J, Suh H, Speizer FE, Laden F. Chronic fine and coarse particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the Nurses' Health Study. *Environ Health Perspect*. 2009;117(11):1697–701.
38. Sunyer J, Schwartz J, Tobías a, Macfarlane D, Garcia J, Antó JM. Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *Am J Epidemiol*. 2000;151(1):50–6. Available at:
39. Schwartz J. Air pollution and children's health. *Pediatrics*. 2004;113(4 suppl):1037–1043.
40. Ostro B, Lipsett M, Reynolds P, Goldberg D, Hertz A, Garcia C, Henderson KD, Bernstein L. Long-term exposure to constituents of fine particulate air pollution and mortality: results from the California Teachers Study. *Environ Health Perspect*. 2010;118(3):363–9.
41. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong W, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lulis AJ, Nel AE, Geffen D. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res*. 2008;102(5):589–596.

42. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health*. 2002;65(20):1513–1530.
43. Oberdörster G, Sharo Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling WG, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health*. 2002;65(20):1531–1543.
44. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett*. 2004;149(1-3):243–53.
45. Kido T, Tamagawa E, Bai N, Suda K, Yang H-HC, Li Y, Chiang G, Yatera K, Mukae H, Sin DD, Van Eeden SF. Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):197–204.
46. Quan C, Sun Q, Lippmann M, Chen L-C. Comparative effects of inhaled diesel exhaust and ambient fine particles on inflammation, atherosclerosis, and vascular dysfunction. *Inhal Toxicol*. 2010;22(9):738–753.
47. Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):826–30.
48. Bastonini E, Verdone L, Morrone S, Santoni A, Settimo G, Marsili G, La Fortezza M, Di Mauro E, Caserta M. Transcriptional modulation of a human monocytic cell line exposed to PM(10) from an urban area. *Environ Res*. 2011;111(6):765–74.
49. Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Shah Z, Deiuliis JA, Xu X, Kherada N, Brook RD, Reddy KM, Nitin P, Parthasarathy S, Chen LC, Moffatt-bruce S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ Res*. 2011;108(6):716–726.
50. Xu X, Liu C, Xu Z, Tzan K, Zhong M, Wang A, Lippmann M, Chen L-C, Rajagopalan S, Sun Q. Long-term exposure to ambient fine particulate pollution induces insulin resistance and mitochondrial alteration in adipose tissue. *Toxicol Sci*. 2011;124(1):88–98.
51. Tan WC, Qiu D, Liam BL, Ng TP, Lee SH, van Eeden SF, D'Yachkova Y, Hogg JC. The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1213–7.
52. Peters a, Fröhlich M, Döring a, Immervoll T, Wichmann HE, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W. Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men; results from the MONICA-Augsburg Study. *Eur Heart J*. 2001;22(14):1198–204.
53. Li Y, Rittenhouse-Olson K, Scheider W, Mu L. Effect of particulate matter air pollution on C-reactive protein: a review of epidemiologic studies. *Rev Environ Health*. 2012;27(2-3):133–149.
54. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol*. 2011;2011:487074.

55. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel a E. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol.* 1999;163(10):5582–91.
56. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Schmitz D, Stefano E Di, Slaughter N, Killeen E, Wang X, Wang M, Miguel AH, Cho A, Sioutas C, Nel AE, Eiguren-fernandez A. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol.* 2004;173(5):3467–3481.
57. Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD. Acceleration of Atherosclerosis and Vascular Inflammation in an Animal Model. *Jama.* 2005;294(23):3003–3010.
58. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo J a, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50781–90.
59. Wang M, Xiao GG, Li N, Xie Y, Loo J a, Nel AE. Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals. *Electrophoresis.* 2005;26(11):2092–108.
60. Kleinman M, Araujo JA, Nel AE, Sioutas C, Campbell A, Cong P, Li H, Bondy S. Inhaled ultrafine particulate matter affects CNS inflammatory processes and may act via MAP kinase signaling pathways. *Toxicol Lett.* 2008;178(2):127–130.
61. Folkmann JK, Risom L, Hansen CS, Loft S, Møller P. Oxidatively damaged DNA and inflammation in the liver of dyslipidemic ApoE^{-/-} mice exposed to diesel exhaust particles. *Toxicology.* 2007;237(1-3):134–44.
62. Tan H, Fiel MI, Sun Q, Guo J, Gordon RE, Chen L, Friedman SL, Odin JA, Allina J. Kupffer cell activation by ambient air particulate matter exposure may exacerbate non-alcoholic fatty liver disease. *J Immunotoxicol.* 2009;6(4):266–275.
63. Zheng Z, Xu X, Zhang X, Wang A, Zhang C, Hüttemann M, Grossman LI, Chen LC, Rajagopalan S, Sun Q, Zhang K. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. *J Hepatol.* 2013;58(1):148–54.
64. Tomaru M, Takano H, Inoue K-I, Yanagisawa R, Osakabe N, Yasuda A, Shimada A, Kato Y, Uematsu H. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances fatty change of the liver in obese diabetic mice. *Int J Mol Med.* 2007;19(1):17–22.
65. Cotrim HP, Andrade Z a, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas L a. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver.* 1999;19(4):299–304.
66. Cotrim HP, De Freitas L a R, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F, Paraná R, Santos-Jesus R, Andrade Z. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. *Liver Int.* 2004;24(2):131–5.

67. Carvalho FM, Silvany Neto A, Mendes J, Cotrim HP, Nascimento A, Lima Júnior A, da Cunha T. Alteração de enzimas hepáticas em trabalhadores de refinaria de petróleo Liver enzyme abnormalities among oil refinery workers. *Rev Saude Publica*. 2006;40(1):92–98.
68. Perrone MG, Gualtieri M, Consonni V, Ferrero L, Sangiorgi G, Longhin E, Ballabio D, Bolzacchini E, Camatini M. Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or remote site origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary cells. *Environ Pollut*. 2013;176:215–27.
69. World Health Organization. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.; 2005.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-16/09

Certificamos que o protocolo (P-29/09-4), intitulado "Avaliação do comprometimento hepático na exposição à micropartículas emitidas pela combustão de diesel/biodiesel.", sob a responsabilidade de LUIZ ANTONIO RODRIGUES DE FREITAS, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 19/10/2013 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 300 Machos de C57Bl/6, Idade: 4 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 19 de outubro de 2009

Dr^o Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora