



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



## **Monografia**

# **Avaliação do comprometimento hepático à exposição a micropartículas poluentes: Análise da expressão de citocinas**

Estefane Evelin Gaspar da Silva

Salvador (Bahia)  
Fevereiro, 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

S586 Silva, Estefane Evelin Gaspar da  
Avaliação do comprometimento hepático à exposição a micropartículas poluentes: Análise de expressão de citotinas / Estefane Evelin Gaspar da Silva. Salvador: EEG, Silva, 2013.

VIII; 38 fls. : il. [fig., graf.].

Inclui anexos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas.

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

1. Esteato-hepatite não alcoólica. 2. Poluição do ar. 1. 3. Fígado. I. Freitas, Luiz Antônio Rodrigues de. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU – 616.36-002



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



## **Monografia**

# **Avaliação do comprometimento hepático à exposição a micropartículas poluentes: Análise da expressão de citocinas**

**Estefane Evelin Gaspar da Silva**

Professor orientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**  
Coorientadora: **Juliana Ribeiro 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 à exposição a micropartículas poluentes: Análise da expressão de citocinas*, de **Estefane Evelin Gaspar da Silva**

Professor orientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**

Coorientador: **Juliana Ribeiro de Freitas**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Luiz Antonio Rodrigues de Freitas** (presidente), Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Bahia e do Programa de Pós-graduação em Patologia da UFBA/Fiocruz da Universidade Federal da Bahia.
  
- **Gilberto Cafezeiro Bonfim**, Professor do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal da Bahia.
  
- **Antonio Ricardo Cardia Ferraz de Andrade**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) 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.

God bless you in your travels.

In your conquests and queries. (...)

(extraído da canção “No pressure over  
cappuccino”, de **Alanis Morissette**)

À minha avó Tânia e meu irmão Bruno por acreditarem em mim desde sempre. À Jéssica pelo amor que me renova todos os dias. À minha mãe e Betinho pelo entusiasmo. À Marquinhos pelo amor e amizade incondicionais. À Ruan por me tornar grande e capaz. Aos familiares Sueli, Victor e tia Vânia. Aos amigos do CEFET (Pedro, Monta, Mai, Jú, Napê e Carol) pelo maior aprendizado de todos: sonhar junto e ir em diante. Aos melhores educadores: Sinval e Sônia Neves. À família Almeida pela família. À Zezé pela confiança e por ajudar a tornar tudo isso possível. Aos amigos dos tempos rebeldes (Daiana, Deisinha e o clã). À Carol, Rosa e Souza pelos abraços, pelas mãos dadas e por me fazerem acreditar que tenho talento na medicina. Aos amigos da FAMEB.

À minha avó Tânia, meu irmão Bruno,  
minha mãe Cristina  
e à Jéssica, minha companheira e maior  
inspiração.

## **EQUIPE**

- Estefane Evelin Gaspar da Silva, estefanegaspar@gmail.com, graduanda de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia
- Daniele Rodrigues Andrade, doutoranda, danirodriguesandrade@hotmail.com, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz
- Juliana Ribeiro de Freitas, coorientadora, julifreitas@yahoo.com.br, Faculdade de Medicina da Bahia, Departamento de Patologia e Medicina Legal
- Niara de Jesus Almeida, mestranda, niara\_almeida@hotmail.com, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz
- Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, orientador, freitas.luizar@gmail.com, Faculdade de Medicina da Bahia, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

### **CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MUNIZ (FIOCRUZ)**

- Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI)

### **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

- Faculdade de Medicina  
Laboratório de Poluição Ambiental

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)
2. Centro Nacional de Pesquisas (CNPq) – Edital 15/2008



## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Luiz Antonio Rodrigues de Freitas**, por acreditar em meus desígnios acadêmico e profissional na medicina.
- ◆ À Doutora **Juliana Ribeiro de Freitas**, minha coorientadora, pelas sugestões, críticas e disposição para que este trabalho se tornasse realidade.
- ◆ A minha colega **Niara de Jesus Almeida**, pela pronta disposição em colaborar com este trabalho e paciência em lidar com a minha inexperiência na prática laboratorial.
- ◆ A **Daniele Rodrigues Andrade** pela colaboração.
- ◆ Ao Professor **Gilberto Cafezeiro Bonfim** e ao Doutorando **Antonio Ricardo Cardia Ferraz de Andrade**, membros da Comissão Revisora desta Monografia.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	2
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	3
I. RESUMO .....	4
II. OBJETIVOS .....	5
II.1. Principal .....	5
II.2. Secundários .....	5
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	6
IV. METODOLOGIA .....	12
IV.1. Animais .....	12
IV.2. Exposição .....	12
IV.3. Avaliação anatomopatológica .....	13
IV. 4. Avaliação do perfil bioquímico .....	13
IV. 5. Dosagem de citocinas .....	13
IV. 6. Desenho do estudo .....	15
V. RESULTADOS .....	16
V.1. Peso dos animais .....	16
V.2. Glicemia dos animais .....	18
V.3. Níveis de colesterol .....	19
V.4. Níveis de triglicerídeos .....	20
V.5. Enzimas hepáticas .....	21
V.6. Avaliação anatomopatológica .....	22
V.7. Citocinas pró-inflamatórias .....	23
V. DISCUSSÃO .....	29
VI. CONCLUSÕES .....	32
VII. SUMMARY .....	33
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
IX. ANEXO .....	37
X.1. Anexo A. Dieta hipercalórica .....	37
X.2. Anexo B. Parecer do Comitê de Ética .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

DHGNA.....	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
MP <sub>2,5</sub> .....	Micropartículas Poluentes
ALT.....	Alanina Aminotransferase
AST.....	Aspartato Aminotransferase
MCP-1.....	Monocyte Chemotactic Protein-1/ Proteína Quimiotática de Monócitos
SM.....	Síndrome Metabólica
IMC.....	Índice de Massa Corporal
TNF.....	Tumor Necrosis Factor/ Fator de Necrose Tumoral
INF- $\gamma$ .....	Interferon Gamma/ Interferon Gama
CHC.....	Carcinoma Hepatocelular
EHNA.....	Esteato Hepatite Não-Alcoólica
ERO.....	Espécie Reativa de Oxigênio
CBA.....	Citokine Bead Array

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Peso dos animais após introdução de dietas do biotério e hipercalórica.....	16
Figura 2: Camundongos C57BL6, alimentados com dieta do biotério (esquerda) e com dieta hipercalórica (direita) .....	16
Figura 3. Peso dos animais magros expostos ou não a MP <sub>2,5</sub> .....	17
Figura 4. Peso dos animais gordos expostos ou não a MP <sub>2,5</sub> .....	17
Figura 5. Glicemia dos animais .....	18
Figura 6. Glicemia dos animais de acordo com as dietas dadas após exposição a MP <sub>2,5</sub> .....	18
Figura 7. Glicemia dos animais magros mediante exposição a MP <sub>2,5</sub> .....	19
Figura 8. Glicemia dos animais gordos mediante exposição a MP <sub>2,5</sub> .....	19
Figura 9. Níveis de colesterol dos animais .....	20
Figura 10. Níveis de triglicérides sérico dos animais .....	20
Figura 11. Níveis de a ALT nos animais de acordo com a dieta dada.....	21
Figura 12. Níveis de a AST nos animais de acordo com a dieta dada .....	21
Figura 13. Presença de esteatose hepática nos subgrupos.....	22
Figura 14. Presença de inflamação nos subgrupos .....	22
Figura 15. Presença de balonização nos subgrupos .....	23
Figura 16. Presença de fibrose nos subgrupos.....	23
Figura 17. Níveis de INF- $\gamma$ nos subgrupos .....	24
Figura 18. Níveis de TNF- $\alpha$ nos subgrupos.....	24
Figura 19. Níveis de IL-6 nos subgrupos .....	24
Figura 20. Níveis de IL-10 nos subgrupos .....	25
Figura 21. Níveis de IL-12 nos subgrupos .....	25
Figura 22. Níveis de MCP-1 nos animais expostos a MP <sub>2,5</sub> .....	26
Figura 23. Níveis de MCP-1 nos animais magros .....	26
Figura 24. Níveis de MCP-1 nos animais expostos a MP <sub>2,5</sub> .....	27
Figura 25. Níveis de MCP-1 nos animais não expostos a MP <sub>2,5</sub> .....	27
Figura 26. Níveis de MCP-1 nos animais gordos expostos e não expostos a MP <sub>2,5</sub> .....	28

## I. RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO HEPÁTICO À EXPOSIÇÃO A MICROPARTÍCULAS POLUENTES; ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS.**

**Introdução:** A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) está associada a doenças bastante prevalentes no mundo ocidental – diabetes, obesidade, dislipidemia - e compreende um espectro de alterações morfológicas que vão da esteatose à esteato-hepatite, podendo evoluir para a cirrose hepática. Os fatores que determinam a progressão da DHGNA são alvos de investigação científica. Pesquisadores sugerem que o estado inflamatório, provocado por produtos bacterianos da microbiota intestinal e mesmo a exposição a micropartículas poluentes (MP<sub>2,5</sub>) oriunda da queima de diesel podem estar implicadas nesse processo. **Objetivos:** Avaliar o efeito da inalação de MP<sub>2,5</sub> na progressão da doença gordurosa hepática de camundongos C57BL/6 induzida por dieta hiperlipídica, analisando as lesões histológicas hepáticas, alterações bioquímicas e produção de citocinas pró-inflamatórias. **Metodologia:** Camundongos C57BL/6 foram divididos de acordo com a dieta oferecida (dieta regular do biotério ou dieta hipercalórica) e em seguida foram subdivididos conforme a exposição ou não a MP<sub>2,5</sub>. Foram realizadas análises bioquímicas de enzimas hepáticas no soro e anatomopatológica do tecido hepático, e produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado. **Resultados:** Os achados anatomopatológicos característicos da DHGNA foram frequentes nos animais gordos independente da inalação de MP<sub>2,5</sub>. A dieta hipercalórica tornou os camundongos C57BL/6 obesos e elevou os níveis de glicose, colesterol e alanina aminotransferase (ALT). A exposição a MP<sub>2,5</sub> causou alteração dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e a produção de níveis aumentados de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) em fígados de camundongos C57BL/6 obesos. **Discussão:** A avaliação qualitativa das secções histológicas de fígado, análise bioquímica, e níveis MCP-1 sugerem que a exposição a MP<sub>2,5</sub> oferece risco adicional à progressão da DHGNA. **Conclusão:** Camundongos C57BL/6 obesos e expostos a MP<sub>2,5</sub> apresentaram níveis aumentados de MCP-1, indicando a sua participação na ativação e recrutamento de macrófagos na DHGNA. **Palavras-chave:** 1. esteato-hepatite não alcoólica; 2. poluição do ar; 3. fígado

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Principal**

Avaliar o efeito da inalação de micropartículas poluentes (MP<sub>2,5</sub>) na progressão das alterações em fígados gordos de camundongos C57BL/6.

### **II.2. Secundários**

Avaliar se camundongos C57BL/6 com fígado gordo e expostos a MP<sub>2,5</sub> apresentam progressão das lesões hepáticas, alteração no perfil bioquímico de enzimas hepáticas e na produção de citocinas pró-inflamatórias.

### III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) compreende um espectro de alterações histopatológicas (esteatose, inflamação lobular, balonização e fibrose) semelhantes às observadas no alcoolismo, acometendo pacientes sem história prévia de abuso no consumo de álcool. Essa doença tem se tornado foco de pesquisas científicas por causa da sua associação a morbididades prevalentes no ocidente – obesidade, dislipidemias, síndrome metabólica e diabetes *mellitus* tipo II –, vinculadas a um estilo de vida sedentário e a hábitos alimentares considerados deletérios para a saúde. O motivo de a DHGNA estar relacionada a essas morbididades é o desequilíbrio metabólico somado ao aumento da resistência periférica à insulina, comum a várias dessas doenças (1,2). Além disso, toxinas ambientais como produtos químicos (3), medicamentos (amiodarona, corticosteroides, estrógenos sintéticos, nifedipina, tamoxifeno) e cirurgias de derivação intestinal (by-pass) (derivação biliopancreática e by-pass jejuno-ileal) (4,5) são fatores de risco para a DHGNA.

A DHGNA é a doença hepática crônica de maior ocorrência no mundo ocidental, tendo maior incidência em indivíduos com mais de 40 anos, homens e nas etnias caucasiana e hispânica. Estudos populacionais sugerem uma prevalência de até 30% na população americana, número que se eleva na vigência de fatores como aumento da idade e de comorbidades como diabetes *mellitus* tipo II, obesidade, dislipidemias e síndrome metabólica (SM). Estudos com biópsia *in vivo* ou *pos mortem* de doadores de órgãos jovens, com saúde em bom estado, com sobrepeso ou obesos, com nenhum ou leve consumo de bebidas alcoólicas mostram taxas de prevalência significativas de DHGNA de 17,9% no Japão e 34% nos Estados Unidos (5,6).

Embora a prevalência da DHGNA no Brasil não seja conhecida (7), Cotrim e colaboradores demonstraram em estudo multicêntrico com 1280 pacientes de grandes cidades de cinco regiões do país (centro, norte, nordeste, sudeste e sul) que a dislipidemia, o excesso de peso e o diabetes foram as principais comorbidades relacionadas à DHGNA (8). Desse modo, avaliar a ocorrência das

doenças mais comumente relacionadas à DHGNA fornece uma ideia da sua incidência na população brasileira.

Nas últimas décadas, o país tem vivenciado uma transição nutricional com redução da desnutrição e aumento da obesidade (7) e segundo o Ministério da Saúde (VIGITEL), em 2012 cerca de 51% da população brasileira tinha excesso de peso. Em Salvador, 47,3% da população está acima da faixa de peso ideal. Já em relação ao diabetes, os índices brasileiros de 2011 (VIGITEL) apontaram uma prevalência de 5,3% e em Salvador 5,5%. Esses dados indicam que a DHGNA pode estar alcançando níveis epidêmicos na população brasileira, sobretudo porque na maioria dos pacientes ela é assintomática, podendo se configurar num sério problema de saúde pública.

A DHGNA abrange um espectro de alterações histológicas que vão da esteatose pura a esteatohepatite. A progressão de uma simples esteatose pura para os estágios mais avançados da DHGNA não é um desfecho inexorável. Estima-se que dos pacientes que tem somente esteatose cerca de 3-5% progridem para a esteatohepatite não alcoólica, e 5% desenvolverão cirrose. Os fatores determinantes dessa progressão não estão esclarecidos (9,10).

O entendimento da DHGNA passa pelo reconhecimento dos papéis do fígado no controle endócrino-metabólico dos lipídios para a manutenção da homeostase no organismo. Parte da gordura mobilizada dos adipócitos ou ingeridas na dieta ganha a circulação a caminho do fígado que é responsável por distribuí-la para as seguintes finalidades: armazenamento hepático (há uma reserva de cerca de 5% de volume de gordura no fígado humano), utilização para metabolismo próprio e distribuição para os tecidos periféricos, mediante ligação com as proteínas de transporte (apoproteínas).

No entanto, o excesso de gordura destinado ao fígado provoca o seu acúmulo na forma de esteatose, podendo ser lesivo para o tecido hepático porque a metabolização de ácidos graxos gera estresse oxidativo por aumentar espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando em peroxidação de lipídios e danos às membranas celulares e mitocôndrias dos hepatócitos. Esse *status quo* oxidativo também pode ser responsável por ativar vias inflamatórias (11).



A patogênese da DHGNA não está estabelecida. Uma das hipóteses em voga é a dos hits ou golpes, em que mediante um desequilíbrio no metabolismo de lipídios o fígado apresenta uma resposta adaptativa com a formação da esteatose - o primeiro “hit”. Não se sabe qual é o segundo “hit” ou evento responsável pela progressão da esteatose pura para a esteatohepatite, mas há suspeitas de que eventos pró-inflamatórios podem ser os responsáveis por esse curso (12). Nesse ínterim, as investigações científicas estão em torno de qual seria o fator determinante para a progressão da doença e fatores genéticos, dieta rica em carboidratos, ação de bactérias oriundas do intestino e exposição a micropartículas poluentes são algumas das hipóteses (5,13). Atualmente, tem sido dada uma importância cada vez maior ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta como fator suficiente para a ocorrência de dano hepatocelular e desencadeamento da esteato-hepatite.

Trabalhos experimentais sugerem que a progressão da DHGNA é marcada pelo envolvimento de citocinas pró-inflamatórias - interleucinas 2, 6 e 10, proteína quimiotática de monócitos- 1 (MCP-1), fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (INF-gama) porque se vê o aumento na expressão dos seus genes correspondentes e pela atividade de células do sistema imune (macrófagos, linfócitos, neutrófilos). Os resultados podem ser a lesão hepatocitária, evidenciada na balonização, inflamação, fibrose e cirrose hepática (14).

A esteatose pura resulta do acúmulo de lipídios no citoplasma do hepatócito, é o primeiro estágio da DHGNA, sendo predominantemente macrovesicular e ocorre em região perivenular. Embora não seja exclusiva da DHGNA, a esteatose é considerada uma condição benigna e critério mínimo para o diagnóstico de DHGNA em um fígado não cirrótico. Já a esteatohepatite é caracterizada pela presença de inflamação lobular e/ou portal, constituída por agregados de polimorfonucleares; de balonização de hepatócios (agregados do citoesqueleto resultantes da lesão hepatocitária) localizados na região perivenular; de fibrose sinusoidal e pericelular em região perivenular; e de cirrose (15,16).

O último estágio da DHGNA, a cirrose, pode predispor ao surgimento de carcinoma hepatocelular (CHC), neoplasia primária de fígado que segundo o Instituto Nacional do Câncer Estimativa 2008 (17) não está entre os 10 cânceres mais incidentes. Ainda que o CHC esteja mais

relacionado à infecção pelos vírus das hepatites B e C, a sua associação com a Esteatohepatite Não-Alcoólica tem sido observada, mesmo antes do desenvolvimento da cirrose hepática (18–21).

Na história clínica dos pacientes com DHGNA, além da ausência do abuso do consumo de álcool (> 20 gramas/dia para mulheres e > 30 gramas/dia para homens (22), níveis que não são consenso na literatura) (23,24), queixas inespecíficas como fadiga, desconforto e dor abdominal de difícil caracterização no quadrante superior direito são referidas (25). Nos exames laboratoriais, a elevação dos níveis séricos das aminotransaminases hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), com predomínio de ALT sobre AST, da fosfatase alcalina e da ferritina sérica podem compor o quadro clínico do paciente. O médico deve também suspeitar da DHGNA se estiver diante de um quadro clínico com aminotransaminases elevadas e alterações nos exames laboratoriais (hiperglicemia, teste de tolerância à glicose elevada, colesterol total e frações) que justifiquem a presença das comorbidades relacionadas à DHGNA.

Os exames de imagem (ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) podem ajudar no diagnóstico da DHGNA e a ultrassonografia de abdome é o exame de escolha para o diagnóstico de esteatose hepática (26). Apesar das diferenças de sensibilidade e especificidade de cada técnica, elas não quantificam o grau da presença de cada alteração histológica que compõe o espectro da doença, ou seja, não é possível distinguir uma esteatose pura de uma esteatohepatite nem estádiá-la (22). O diagnóstico da DHGNA é histológico e a biópsia de fígado é o padrão-ouro para a caracterização dos estágios da doença.

Na investigação da DHGNA devem ser excluídos outros diagnósticos diferenciais como doença hepática alcoólica, hepatites virais (sobretudo B e C) e autoimunes, homocromatose, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina e doença de Wilson que causam de aumento dos níveis de aminotransaminases.

O tratamento da DHGNA tem o objetivo de impedir a sua progressão e reverter ou estabilizar as comorbidades que se relacionam a ela. O manejo terapêutico envolve intervenções no estilo de vida como redução de peso, introdução de dieta com menor teor de carboidratos e prática de

exercícios físicos (27), e a prescrição medicamentosa da Pioglitazona e vitamina E, ambas com indicações específicas (28).

### **Os efeitos das micropartículas poluentes na saúde humana**

Os efeitos da poluição do ar na saúde estão sendo investigados e trabalhos demonstraram que a exposição a poluentes urbanos, em sua maioria derivados da combustão de diesel, pode desencadear um estado pró-inflamatório que leva a descompensação do quadro de doença pulmonar obstrutiva crônica, aumentando a hospitalização e a mortalidade desses (29). Van der Zee et al. verificou que crianças com 7-11 anos, com morbidades respiratórias (tosse crônica, asma) prévias e residentes em área urbana foram mais susceptíveis a sintomas respiratórios agudos quando houve elevação da concentração de partículas poluentes do ar (picos de poluição). Ainda, as crianças apresentaram decréscimo >10% no pico de fluxo expiratório (PFE) e recorrência ao uso de medicamentos (broncodilatadores) para alívio sintomático (30).

Estudos populacionais sugerem que a exposição inalatória de  $MP_{2,5}$  pode ter repercussões também prejudiciais ao sistema cardiovascular como eventos coronarianos devido à instabilização de placas de ateroma previamente formadas (31). Miller et al. demonstraram que camundongos ApoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hipercalórica ('Western diet') e expostos (instilação) a partículas oriundas da combustão de diesel apresentaram crescimento de placas ateroscleróticas e de sua complexidade devido ao aumento de lipídios, células inflamatórias, fibrose e lesão por secção da artéria analisada; e indicou que seus dados podem contribuir com eventos cardiovasculares de indivíduos expostos a poluição do ar urbano. Não houve correspondente aumento sistêmico de citocinas pró-inflamatórias (32). Já Miller et al. observaram que ratos expostos a micropartículas oriundas da combustão de diesel desenvolveram uma resposta inflamatória pulmonar e sistêmica devido ao influxo de macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar e à elevação dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no sangue (33).

## **Os efeitos das micropartículas poluentes no fígado**

Os possíveis efeitos da exposição a MP no fígado estão sendo investigados. Tomaru e colaboradores (34) demonstraram que a inoculação intratraqueal de partículas da combustão de diesel aumentou a esteatose em fígado de camundongos C57BL/6 obesos e diabéticos, e sugeriu que o estresse oxidativo, resultante do aumento da produção de ERO no tecido hepático foi o fator causal na elevação de aminotransferases, da esteatose e do peso do fígado. Esse dado tem relevância porque aponta para a possibilidade da exposição ambiental a MPs propiciar um estado inflamatório suficiente para desencadear a progressão da DHGNA.

Considerando que o binômio obesidade e exposição à poluição ambiental é muito frequente nos grandes centros urbanos do mundo ocidental, esclarecer se a exposição micropartículas poluentes contribui para a progressão da DHGNA pode ter um impacto significativo nas medidas de saúde pública, seja fornecendo informações científicas para problematizar sobre os níveis de poluição considerados aceitáveis pelos órgãos de controle de qualidade do ar, seja interferindo na prática médica, sobretudo na atenção básica, onde pode ser ofertado um atendimento voltado para a prevenção e controle dos fatores de risco para DHGNA (35).

Dessa maneira, o presente trabalho pretende investigar se a exposição de camundongos C57BL/6 com fígado gordo a micropartículas poluentes (MP<sub>2,5</sub>) pode precipitar a esteatohepatite ou agravá-la. A hipótese é que haja piora da progressão de DHGNA em camundongos C57BL/6 expostos a MP<sub>2,5</sub>, refletida numa maior inflamação tecidual com produção de citocinas pró-inflamatórias, agressão hepatocelular e fibrose.

## IV. METODOLOGIA

### IV.1. Animais

Camundongos C57BL/6 machos (n= 34 animais) foram divididos em dois grupos conforme dieta a que foram alimentados (dieta hipercalórica vs dieta regular do biotério, vide anexo A). Cada um dos grupos foi alimentado com as dietas por um período de onze meses. O uso dos animais foi previamente autorizado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) (vide anexo B).

### IV.2. Exposição

Os grupos dieta hipercalórica e dieta do biotério foram subdivididos em dois grupos, de acordo com a exposição a micropartículas poluentes (MP<sub>2,5</sub>) oriundas do meio ambiente urbano, localizado no centro de São Paulo, resultando em quatro grupos de análise.

Os grupos estabelecidos foram:

1. Magros não expostos a MP<sub>2,5</sub> (n= 8)
2. Magros expostos a MP<sub>2,5</sub> (n= 7)
3. Gordos não expostos a MP<sub>2,5</sub> (n= 10)
4. Gordos expostos a MP<sub>2,5</sub> (n= 9)

Os camundongos, alocados em câmaras de exposição, foram expostos em um concentrador de micropartículas poluentes com cerca de 25µm de diâmetro e concentração de 25mg/m<sup>3</sup> por hora – 600 mg/m<sup>3</sup> em 24h – (máximo de exposição considerada segura pela Organização Mundial da Saúde), com o tempo de inalação diário de no máximo 4 horas.

Os camundongos não expostos a MP<sub>2,5</sub> foram alocados em uma câmara limpa em que o ar foi filtrado com o auxílio de um filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) assegurando a ausência de micropartículas poluentes.

As micropartículas derivadas da queima de combustíveis foram coletadas do centro urbano de São Paulo nos arredores do Laboratório de Poluição Ambiental de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a utilização de um concentrador de partículas.

O tempo de exposição total foi de 3 semanas e em seguida foi coletado soro sanguíneo dos camundongos para análises bioquímicas, sendo feita a eutanásia por via intraperitoneal e a retirada de tecido hepático para os estudos subsequentes.

### **IV.3. Avaliação anatomopatológica**

Foi realizada análise anatomopatológica qualitativa dos fígados. Fragmentos de fígado foram fixados em formol a 10% e processados com rotina para a preparação de cortes histológicos. As secções foram coradas pelos métodos da hematoxilina & eosina e pelo picro-sirius vermelho (para avaliação da matriz conjuntiva). As frequências das seguintes alterações histológicas foram avaliadas nos diferentes grupos experimentais: esteatose, balonização, inflamação, natureza das células envolvidas na inflamação e local do processo inflamatório e fibrose.

### **IV. 4. Avaliação do perfil bioquímico**

Na Faculdade de Farmácia da UFBA, foi realizada a análise bioquímica do soro dos camundongos com kits comerciais. Foram avaliados os níveis de triglicerídeos, colesterol, alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransaminase (AST).

### **IV. 5. Dosagem de citocinas**

A dosagem de citocinas foi realizada com a técnica de imunofluorescência para a análise das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ .

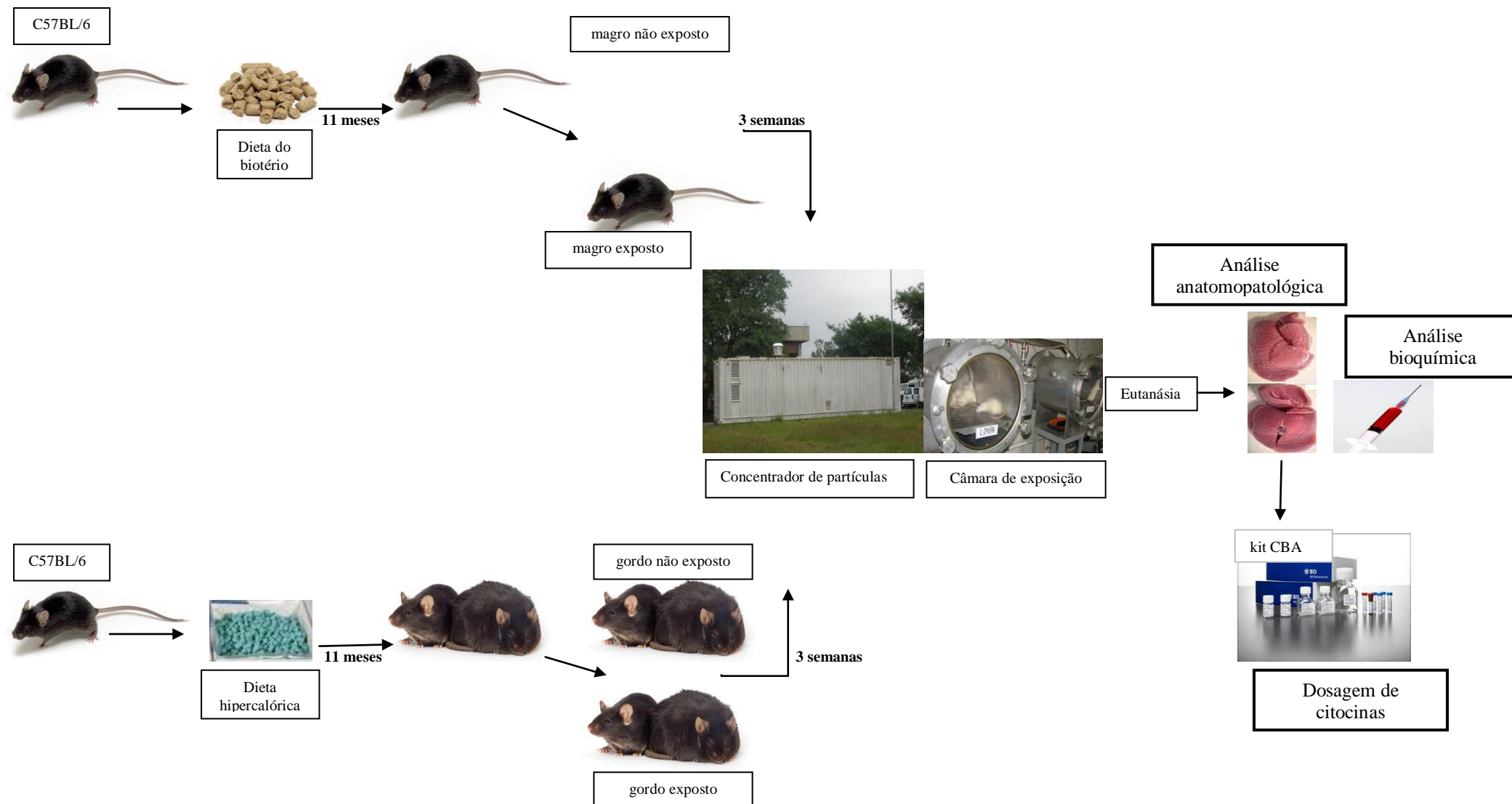
O sistema *Cytokine Bead Array* (CBA) foi o instrumento para a avaliação da presença de citocinas no sobrenadante obtido da maceração dos fígados dos camundongos. O método baseia-se na captura de um ligante (a exemplo de uma citocina) na amostra por um *bead* (carreador), e sua subsequente

identificação por um sistema de detecção composto por um anticorpo específico acoplado a um corante fluorescente (fluorocromo). A faixa de concentração para a detecção do kit CBA é 20-5000 pg/ml para cada citocina analisada.

A ligação do complexo anticorpo-fluorocromo com a citocina é reconhecida por um citômetro de fluxo (BD *FACSArray*) que capta o feixe de fluorescência (comprimento de onda) específico para cada citocina.

Esse sistema permite a identificação e a quantificação simultâneas de múltiplas citocinas em uma única amostra, com redução da necessidade de grandes volumes de amostras, e produz resultados em tempo hábil (36,37).

## IV. 6. Desenho do estudo





## V. RESULTADOS

### V.1. Peso dos animais

A dieta hipercalórica, quando comparada à dieta do biotério, causou o aumento do peso dos camundongos C57BL/6 comprovando a sua eficiência em torná-los obesos (Figs. 1 e 2).

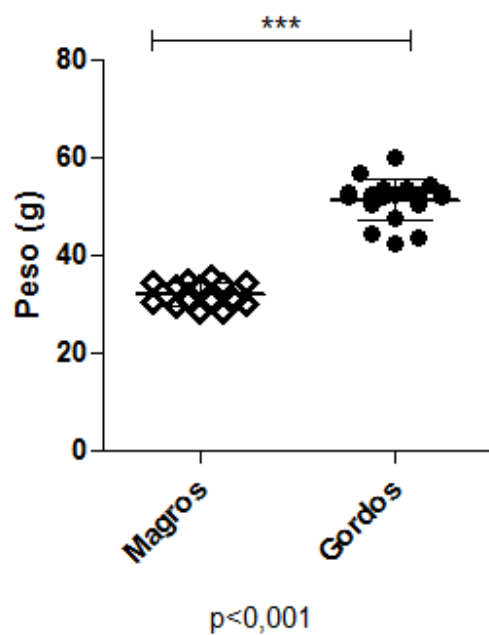


Figura 1. Peso dos animais após introdução de dietas do biotério e hipercalórica



Figura 2: Camundongos C57BL6, alimentados com dieta do biotério (esquerda) e com dieta hipercalórica (direita)

A exposição a  $MP_{2,5}$  não determinou alterações no peso dos animais magros (Fig.3) e gordos (Fig. 4).

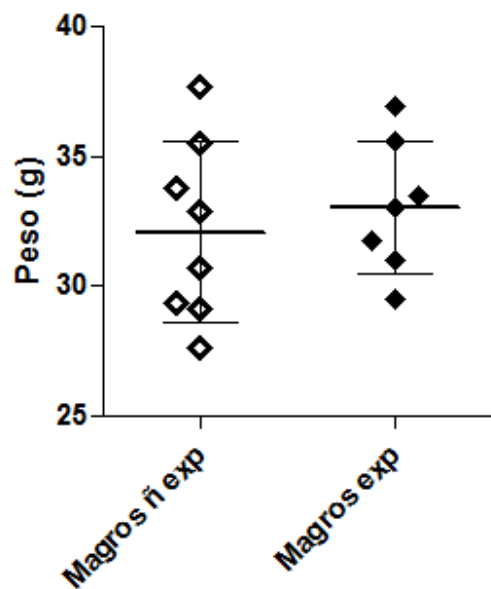


Figura 3. Peso dos animais magros expostos ou não a  $MP_{2,5}$

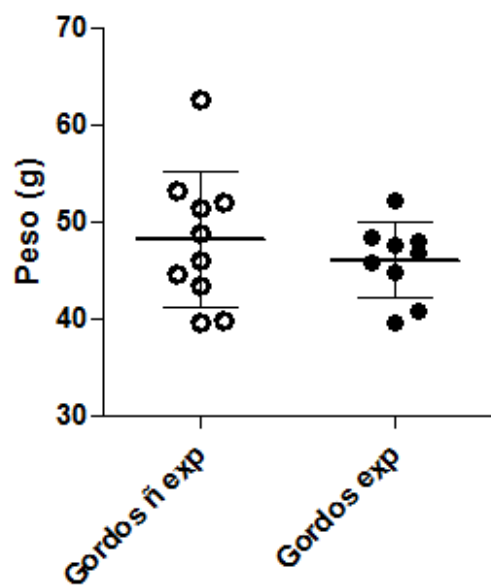


Figura 4. Peso dos animais gordos expostos ou não a  $MP_{2,5}$

## V.2. Glicemia dos animais

A dieta hipercalórica causou hiperglicemia nos animais atestando a sua eficiência em reproduzir um estado diabético nos camundongos (Fig. 5).

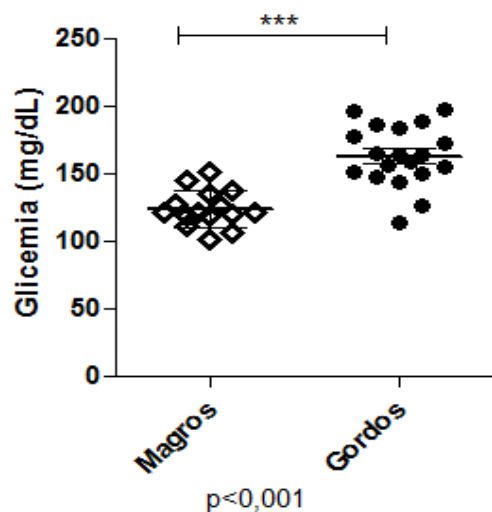


Figura 5. Glicemia dos animais

O estado hiperglicêmico dos animais alimentados com a dieta hipercalórica não sofreu alterações após a exposição a  $MP_{2,5}$  (Fig. 6).

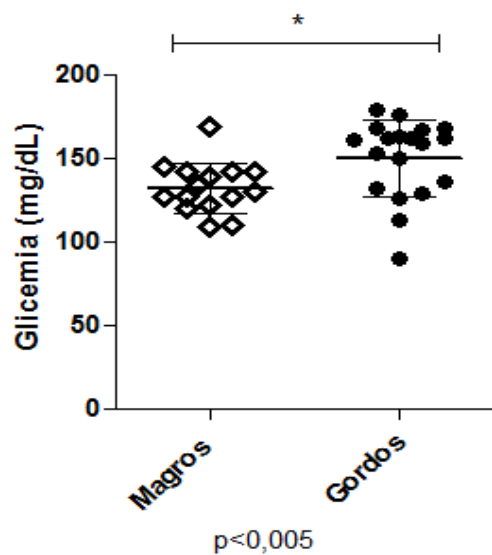


Figura 6. Glicemia dos animais de acordo com as dietas dadas após exposição a  $MP_{2,5}$

A exposição a  $MP_{2,5}$  não afetou a glicemia nos subgrupos magros (Fig. 7) e gordos (Fig. 8).

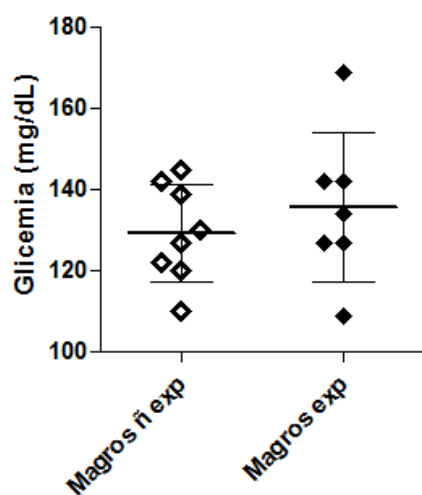


Figura 7. Glicemia dos animais magros mediante exposição a  $MP_{2,5}$

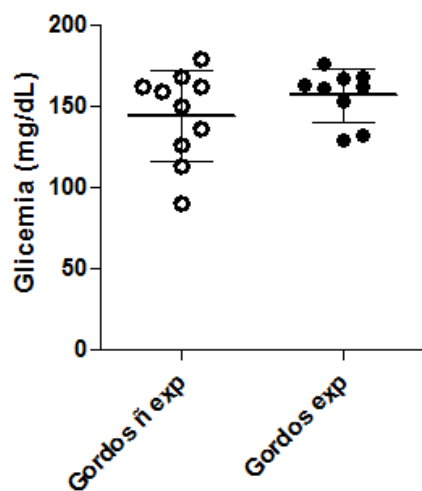


Figura 8. Glicemia dos animais gordos mediante exposição a  $MP_{2,5}$

### V.3. Níveis de colesterol

A dieta hipercalórica também causou hipercolesterolemia nos animais (Fig. 9) evidenciando a sua validade em produzir um animal obeso, com níveis diabéticos e com hipercolesterolemia.

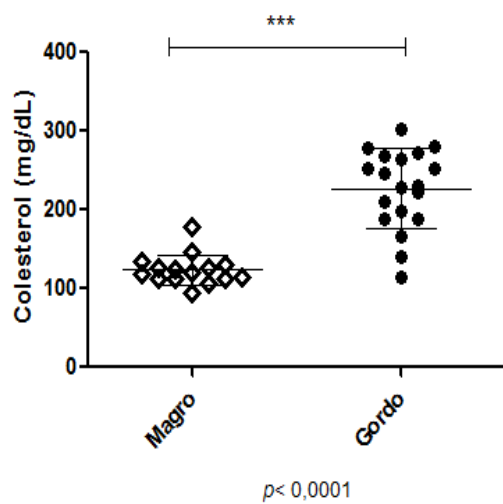


Figura 9. Níveis de colesterol dos animais

#### V.4. Níveis de triglicerídeos

Nenhuma das dietas causou hipertrigliceridemia nos animais magros e gordos (Fig. 10).

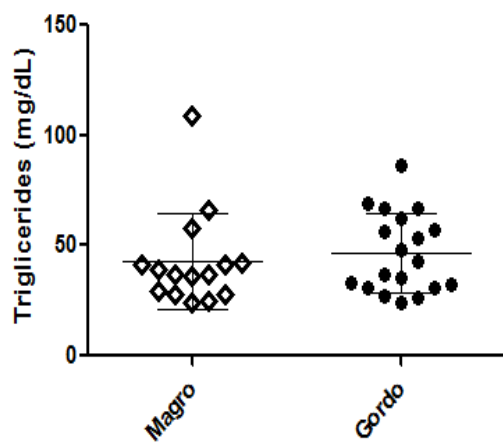


Figura 10. Níveis de triglicerídeos sérico dos animais

## V.5. Enzimas hepáticas

A dieta hipercalórica causou alteração estatisticamente significativa nos níveis das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) (Fig.11) e espartato aminotransferase (AST) (Fig. 12).

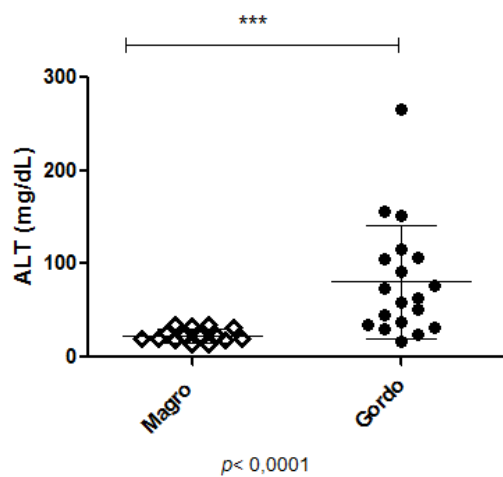


Figura 11. Níveis de a ALT nos animais de acordo com a dieta dada

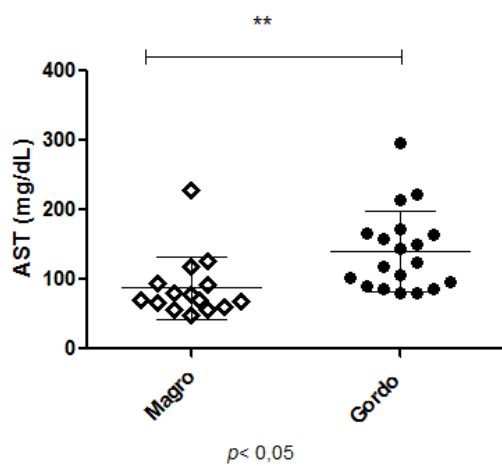


Figura 12. Níveis de a AST nos animais de acordo com a dieta dada

## V.6. Avaliação anatomopatológica

A análise qualitativa dos cortes histológicos dos fígados dos camundongos C57BL/6 demonstrou que os achados histopatológicos que definem a DHGNA (esteatose, inflamação, balonização e fibrose) foram mais prevalentes nos subgrupos gordos expostos e gordos não expostos a MP<sub>2,5</sub> (Figs. 13, 14, 15 e 16).

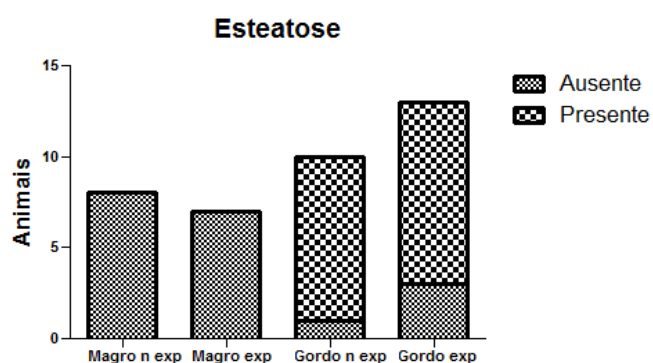


Figura 13. Presença de esteatose hepática nos subgrupos

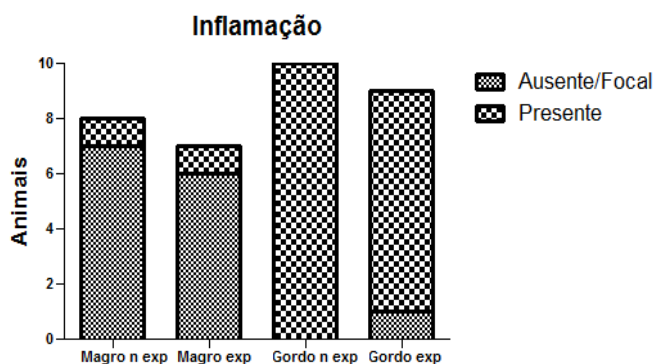


Figura 14. Presença de inflamação nos subgrupos

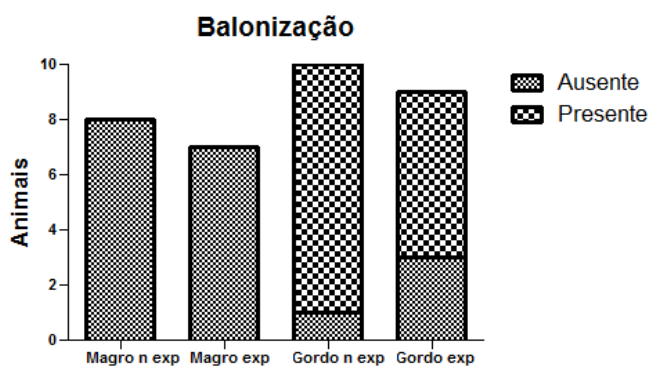


Figura 15. Presença de balonização nos subgrupos

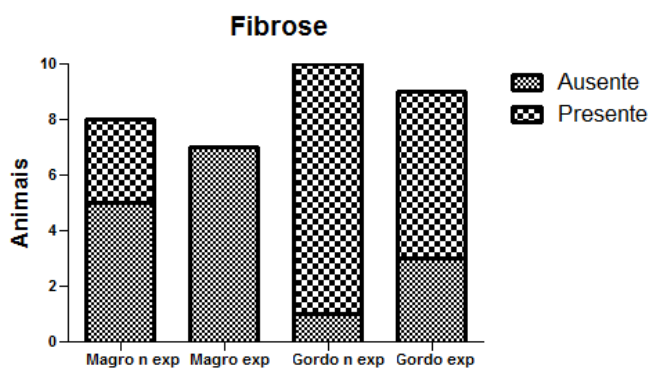


Figura 16. Presença de fibrose nos subgrupos

### V.7. Citocinas pró-inflamatórias

A exposição a  $MP_{2,5}$  não provocou alterações nos níveis das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12 nos animais magros e gordos (Figs. 17, 18, 19, 20 e 21).



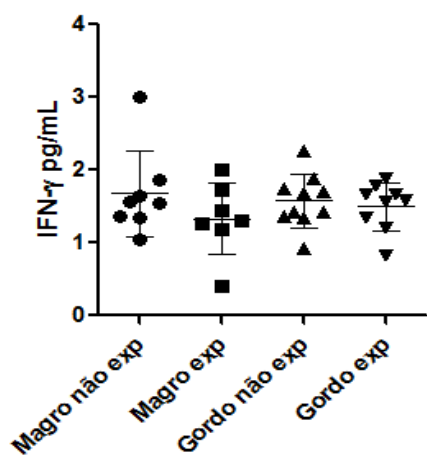


Figura 17. Níveis de IFN- $\gamma$  nos subgrupos

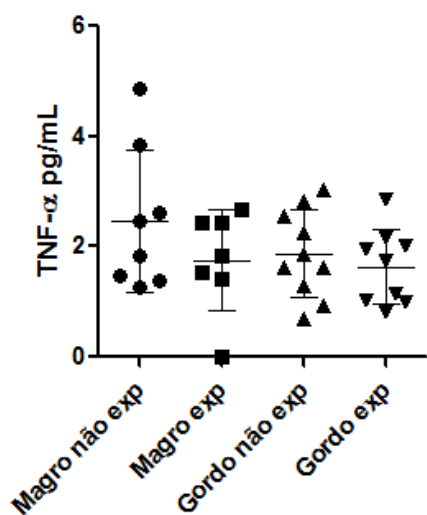


Figura 18. Níveis de TNF- $\alpha$  nos subgrupos

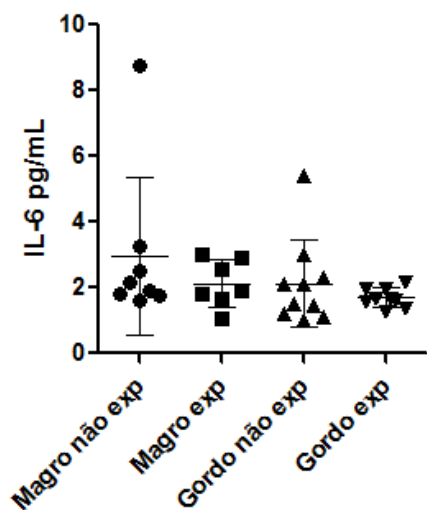


Figura 19. Níveis de IL-6 nos subgrupos

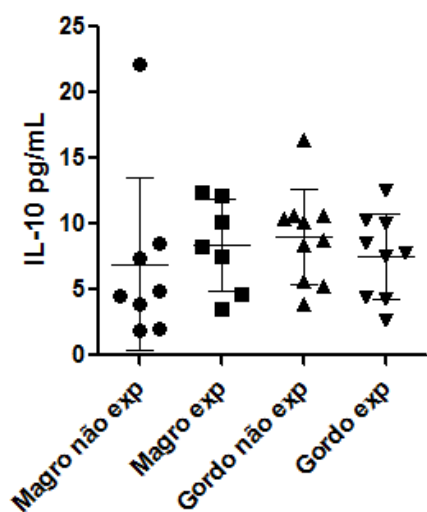


Figura 20. Níveis de IL-10 nos subgrupos

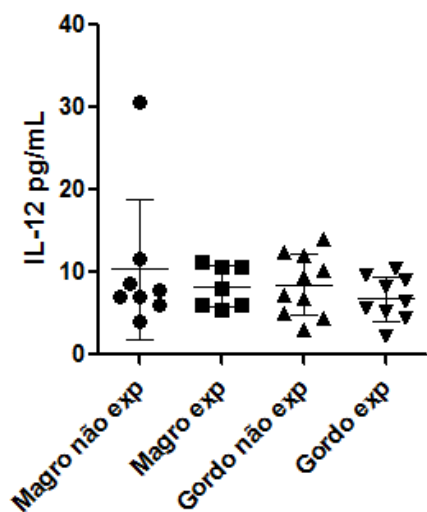


Figura 21. Níveis de IL-12 nos subgrupos

Os níveis da proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) foram significativamente mais elevados nos camundongos gordos independente da exposição a  $MP_{2.5}$  (Fig. 22).

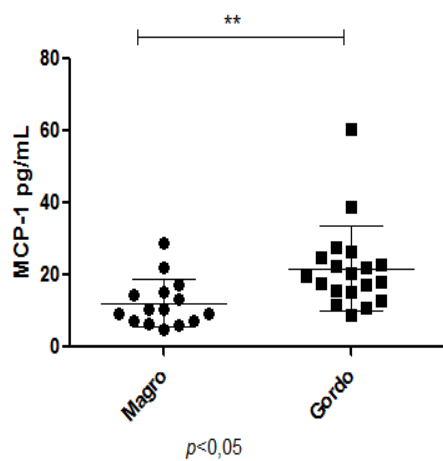


Figura 22. Níveis de MCP-1 nos animais expostos a  $MP_{2,5}$

Na avaliação dos subgrupos, nota-se que a exposição a  $MP_{2,5}$  causou elevação de MCP-1 no subgrupo de magros expostos (Fig. 23) e um aumento estatisticamente significativo no subgrupo gordo exposto (Fig. 24).

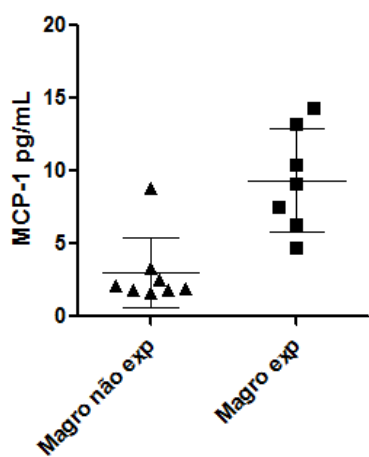


Figura 23. Níveis de MCP-1 nos animais magros

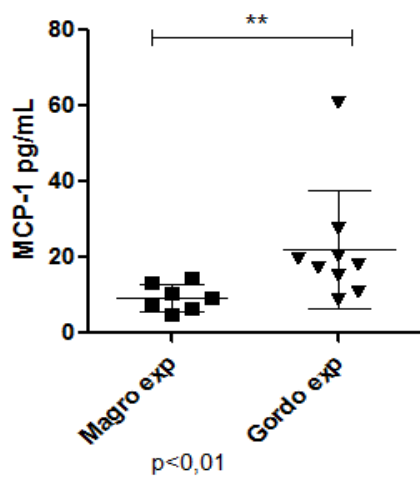


Figura 24. Níveis de MCP-1 nos animais expostos a MP<sub>2,5</sub>

Os níveis de MCP-1 foram semelhantes entre os animais magros e gordos não expostos a MP<sub>2,5</sub> (Fig. 25), já entre os animais gordos aqueles expostos a MP<sub>2,5</sub> apresentaram maiores níveis de MCP-1 (Fig. 26).

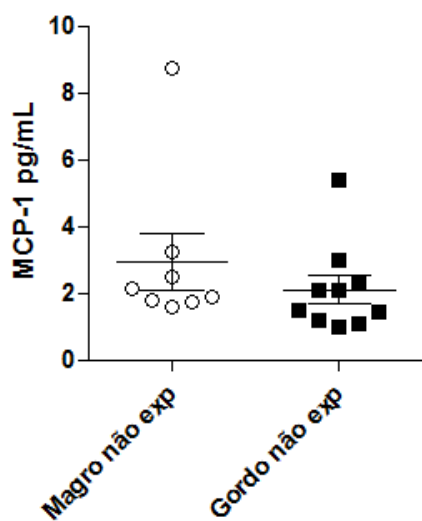


Figura 25. Níveis de MCP-1 nos animais não expostos a MP<sub>2,5</sub>

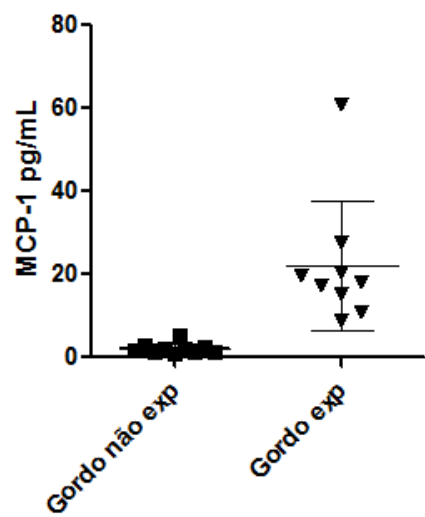


Figura 26. Níveis de MCP-1 nos animais gordos expostos e não expostos a  $MP_{2,5}$

## V. DISCUSSÃO

Obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia e dislipidemia estão associadas à DHGNA (38,39), de modo que estudos experimentais que objetivam elucidar os fatores envolvidos na patogênese dessa doença têm utilizado modelos animais manipulados ou não geneticamente em regime de dieta hipercalórica a fim de causar estados hiperglicêmico, dislipidêmico e obesidade (38,40). Nesse sentido, o presente estudo demonstrou a validade da dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6 uma vez que após 11 meses os animais ficaram obesos (Figs. 1 e 2), com hiperglicemia (Fig. 5) e hipercolesterolemia (Fig. 9). Essas alterações metabólicas causadas pela dieta hipercalórica (Figs. 3, 4, 6 7 e 8) não foram modificadas pela exposição a MP.

A análise das aminotransaminases hepáticas revelou que os animais alimentados com dieta hipercalórica tiveram aumento significativo nos níveis ALT e AST quando comparados aos animais alimentados com a dieta do biotério (Figs. 11 e 12), de onde se pode inferir que o estado de desequilíbrio metabólico causado pela dieta hipercalórica repercutiu com dano hepático.

A avaliação anatomopatológica qualitativa evidenciou que os animais gordos expostos e não expostos a MP<sub>2,5</sub> desenvolveram alterações histológicas características da DHGNA - esteatose, inflamação, balonização e fibrose (Figs. 13, 14, 15 e 16) . Esse resultado é relevante porque o modelo in vivo proposto para esse experimento se aproxima do real, seja porque os animais não foram modificados geneticamente a fim de torná-los predispostos a distúrbios endócrino-metabólicos, seja pelas condições experimentais as quais foram submetidos - dieta hipercalórica fornecida em livre demanda, via de exposição inalatória e o nível de exposição foi o limite máximo preconizado pela OMS (25 mg/m<sup>3</sup>h) para o ser humano. Essas intervenções mostraram-se suficientes para causar distúrbios metabólicos e simular a DHGNA que ocorre nos seres humanos. Embora qualitativamente as lesões características da DHGNA tenham sido presentes nos animais gordos expostos e não expostos a MP<sub>2,5</sub>, é possível que a intensidade das lesões seja diferente, hipótese que somente será confirmada com a análise anatomopatológica quantitativa, ainda em fase de execução.

Os efeitos da exposição à micropartículas poluentes do ambiente urbano na DHGNA foram investigadas por Ze Zheng et al. que demonstraram o desenvolvimento de um fenótipo “*NASH-like*” com esteatose, inflamação portal e lobular e fibrose perissinusoidal em camundongos que inalaram  $MP_{2,5}$  durante 10 semanas (41). Hui-hui Tan verificou que camundongos C57BL/6 gordos que inalaram concentrado de micropartículas poluentes durante seis semanas também tiveram esteatose, inflamação lobular, balonização e corpúsculos de Mallory (42). No presente estudo, a avaliação anatomopatológica qualitativa é concordante com os dados da literatura pois os camundongos C57BL/6 com fígado gordo expostos a  $MP_{2,5}$  desenvolveram esteatose, balonização, inflamação lobular e fibrose quando comparados aos animais magros expostos (Figs. 13, 14, 15 e 16).

Supõe-se que a lipotoxicidade prevista na patogênese da DHGNA eleve a expressão de citocinas pró-inflamatórias (43). Alguns trabalhos apontaram o aumento dos níveis de RNA mensageiro da citocina IL-6, RNA mensageiro da citocina IL-12 e TNF- $\alpha$  em células de Kupffer em cultura expostas a  $MP_{2,5}$  *in vitro* (42). Todavia, os níveis das citocinas pró-inflamatórias INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12 nas amostras de fígado macerado dos animais de todos os grupos deste trabalho foram semelhantes, com exceção da proteína quimiotática MCP-1/CCL2.

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1/ CCL2) é uma das principais quimiocinas responsáveis por regular a migração e a infiltração de monócitos para os locais de inflamação. A MCP-1 é produzida por células que desempenham papéis importantes na ativação imune da circulação periférica e tecidos, e sua principal fonte parece ser os próprios monócitos (44). A análise dos níveis de MCP-1 com a técnica de citometria de fluxo evidenciou que a dieta hipercalórica elevou de maneira significativa os níveis de MCP-1 (Fig. 22) sendo capaz de causar um estado pró-inflamatório. Esse achado corrobora com o trabalho de Bertola et al. que demonstrou uma elevação na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias dentre elas a MCP-1 (45) em pacientes obesos. A análise dos subgrupos mostrou que a exposição (Fig. 23) individualmente causou uma elevação nos níveis de MCP-1 nos animais, mas quando a exposição a MP esteve associada aos efeitos da dieta hipercalórica nos animais gordos os níveis de MCP-1 foram significativos (Fig. 24). Essa evidência sugere a vigência de um estado pró-inflamatório que pode ter sido determinante na

progressão da DHGNA, e se constitui numa observação que corrobora com a hipótese do presente trabalho.

Embora, os níveis de MCP-1 se aproximem do limiar de detecção do CBA kit, esse resultado é promissor pois se sabe que as citocinas atuam de forma parácrina, em quantidades tão pequenas que possivelmente não tenham sido “perceptíveis” (sensibilidade) à detecção do sistema CBA kit. Além disso, a ação das citocinas pró-inflamatórias pode ter sido importante nos estágios iniciais da DHGNA como observou Xing et al. ao investigarem a função imune de monócitos em pacientes com hepatite B crônica, falências hepáticas aguda e crônica e cirrose perceberam que a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foi maior nos estágios iniciais dessas doenças e decresceu à medida que as mesmas avançaram. Xing propôs que a citocina IL-10 pode ter um papel importante na modulação dessa resposta imune (Xing, Li, Cao, & Huang, 2007).

Outro ponto destacável é que a amostra (macerado de fígado) desse experimento difere das amostras utilizadas pelos trabalhos publicados, normalmente o sangue dos animais que é usado para testes com as técnicas de citometria de fluxo e Elisa (46–48). Esse fato torna o presente trabalho pioneiro, pois não há até então parâmetros de detecção de citocinas no tecido hepático.

O cruzamento de achados obtidos por técnicas adicionais como a extração de RNA e a imunohistoquímica que já estão sendo realizadas pelo nosso grupo poderá ajudar a elucidar os resultados apresentados.



## VI. CONCLUSÕES

1. Camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hipercalórica por um período de 11 meses desenvolveram desequilíbrio metabólico, tornando-se obesos, diabéticos e dislipidêmicos, e tendo repercussão hepática. Notou-se que o modelo de dieta proposto foi eficaz em produzir DHGNA.
2. A exposição a MP<sub>2,5</sub> revelou-se um componente agravante no desenvolvimento da DHGNA, sobretudo nos animais gordos, pois se observou que eles produziram níveis significativos de MCP-1, de onde se pode inferir que ocorreu a ativação e o recrutamento de macrófagos intermediados por essa quimiocina.

## VII. SUMMARY

### ASSESSMENT OF HEPATIC IMPAIRMENT EXPOSURE TO POLLUTANTS MICROPARTICLES: ANALYSIS OF CYTOKINE EXPRESSION INTRODUCTION.

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is associated with common diseases in the Western world - diabetes, obesity, dyslipidemia - and includes a spectrum of pathological characteristics with implications from steatosis to steatohepatitis with the possibility of progression to cirrhosis liver. Scientific researchers looking for the determinants factors of the NAFLD progression. Researchers suggest that the inflammatory condition caused by bacterial products from the intestinal microbiota and exposure to pollutants microparticles (PM<sub>2.5</sub>) originating from the combustion of diesel may be involved in this process. **Objectives:** Evaluate the inhalation effect of PM<sub>2.5</sub> in fatty livers of C57BL/6 mice and its possible repercussions as oxidative stress with production of proinflammatory cytokines, hepatocellular damage and biochemical changes. **Methods:** C57BL/6 mice had been divided according to the diet (regular vivarium diet or high calorie diet) and had been subdivided according to exposure to PM<sub>2.5</sub>. Biochemical analysis of serum and liver tissue, research and pro-inflammatory cytokines had been performed. **Results:** The characteristic pathological results of NAFLD had been prevalent in fatty animals independent of inhalation of MP. The high calorie diet has become obese C57BL/6 mice and increased levels of glucose, cholesterol and alanine aminotransferase (ALT). The PM exposure has caused changes in the levels of aspartate aminotransferase (AST) and in the production of relevant levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) of C57BL/6 obese mice. **Discussion:** The liver tissue qualitative evaluation, biochemistry analysis and MCP-1 levels suggest that exposure to PM<sub>2.5</sub> offers additional risk to the NAFLD progression. **Conclusion:** C57BL / 6 obese and exposed to PM<sub>2.5</sub> showed increased levels of MCP-1, indicating its involvement in the activation and recruitment of macrophages in NAFLD. **Keywords:** 1. nonalcoholic steatohepatitis; 2. air pollution; 3. liver

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, de Freitas L a R, Barreto D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(8):837–41.
2. Law K, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis [Internet]*. Elsevier Ltd; 2010 Nov [cited 2013 Nov 5];14(4):591–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21055684>
3. Hp C, Lar DF, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. 2004;131–5.
4. Pathology of the Liver MacSween ' s.
5. Lazo M, Sc M, Clark JM. The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease : A Global Perspective. 2008;
6. Prevalence\_of\_prediabetes\_and\_.PDF.
7. Ferreira VA. Obesidade no Brasil : tendências atuais. 2006;24:71–82.
8. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CPMS, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol [Internet]*. 2011;10(1):33–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301007>
9. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic Fatty Liver Disease : From Steatosis to Cirrhosis Introduction : Early Insights and. 2005;(1998):99–112.
10. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AMS, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol [Internet]*. European Association for the Study of the Liver; 2009 Aug [cited 2014 Jan 28];51(2):371–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501928>
11. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol [Internet]*. 2010 Jan [cited 2014 Feb 2];5:145–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078219>
12. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 2002 Nov;17(11):1136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342188>
13. Park JS, Seo JH, Youn H-S. Gut Microbiota and Clinical Disease: Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr [Internet]*. 2013 Mar;16(1):22–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3746040&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One [Internet]*. 2010 Jan [cited 2013 Nov 8];5(10):e13577. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2962651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Adams L a, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol [Internet]*. 2007 Nov [cited 2013 Nov 1];17(11):863–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728149>
16. Brunt EM. Nonalcoholic Steatohepatitis.
17. Gutierrez J. No Title.
18. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol [Internet]*. 2012 Jun [cited 2014 Feb 1];56(6):1384–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326465>
19. Hepatocellular C. Patients to Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis ? 2007;1761–6.

20. Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular : um panorama clínico \* Hepatocellular carcinoma : a clinical outlook. 2010;59–67.
21. Gastroenterology W, Practice O. Carcinoma hepatocelular ( CHC ): uma perspectiva mundial. 2009;1–15.
22. Afdhal NH. CLINICIAN ' S CORNER Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease A 60-Year-Old Man With Probable Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Weight Reduction , Liver Biopsy , or Both ? 2014;
23. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley K V, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Jan 27];54(1):344–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520200>
24. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. 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* [Internet]. 2012 Jun [cited 2014 Jan 20];55(6):2005–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488764>
25. Harrison S a, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* [Internet]. 2003 Jan;63(22):2379–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609346>
26. Matteoni L, Boente L, Soares D, Leal R, Campos F, Araújo C. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO - ALCOÓLICA : IMPOR TÂNCIA DA UL IMPORTÂNCIA TRA-SONOGRAFIA ABDOMINAL NO DIAGNÓSTICO NONALCOHOLIC FATTY HEPATIC DISEASE : RELEVANCE OF THE DIAGNOSIS ON ABDOMINAL ULTRASOUND. 2011;10–2.
27. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Jan 29];60(9):1278–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3152868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease : Practice Guideline by the American Gastroenterological Association , American Association for the Study of Liver Diseases , and American College of Gastroenterology. *YGAST* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;142(7):1592–609. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.001>
29. Sunyer J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Eur Respir J* [Internet]. 2001 May;17(5):1024–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488305>
30. Zee SC Van Der, Hoek G, Boezen HM, Schouten JP, Wijnen JH Van, Brunekreef B. Acute e V ects of urban air pollution on respiratory health of children with and without chronic respiratory symptoms. 1999;802–12.
31. Pope CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* [Internet]. 2004 Jan 6 [cited 2014 Jan 23];109(1):71–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676145>
32. Miller MR, McLean SG, Duffin R, Lawal AO, Araujo J a, Shaw C a, et al. Diesel exhaust particulate increases the size and complexity of lesions in atherosclerotic mice. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2013 Jan;10:61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330719>
33. Robertson S, Gray G a, Duffin R, McLean SG, Shaw C a, Hadoke PWF, et al. Diesel exhaust particulate induces pulmonary and systemic inflammation in rats without impairing endothelial function ex vivo or in vivo. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 Jan [cited 2014 Jan 29];9(1):9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3361483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Tomaru M, Takano H, Inoue K-I, Yanagisawa R, Osakabe N, Yasuda A, et al. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances fatty change of the liver in obese diabetic mice. *Int J Mol Med* [Internet]. 2007 Jan;19(1):17–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143543>

35. Casas M. *American Family Physician* 415. 2012;86(5).
36. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember J a, Apgar J, Wilson J, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2013 Nov 1];110(3):252–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047203>
37. Richens JL, Urbanowicz R a, Metcalf R, Corne J, O’Shea P, Fairclough L. Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. *J Biomol Screen* [Internet]. 2010 Jun [cited 2013 Nov 1];15(5):562–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176857>
38. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, et al. Insulin Resistance Accelerates a Dietary Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 2007;282–93.
39. Resistance I, Steatohepatitis N. *Insulin Resistance : Cause or Consequence of Nonalcoholic*. 132(1):444–6.
40. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis. 2012;18(19):2300–8.
41. Zheng Z, Xu X, Zhang X, Wang A, Zhang C, Hüttemann M, et al. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2013;58(1):148–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.009>
42. Tan H, Fiel MI, Sun Q, Guo J, Gordon RE, Chen L, et al. *NIH Public Access*. 2011;6(4):266–75.
43. Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. 2012;215–25.
44. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* [Internet]. 2009 Jun [cited 2013 Nov 7];29(6):313–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2755091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Nov 8];5(10):e13577. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2962651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Xing T, Li L, Cao H, Huang J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Dec 1];147(1):184–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1810435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Szczycka M, Ploch S, Obmińska-mrukowicz B. Modulation of Th1 / Th2 cytokine production by selective and nonselective phosphodiesterase inhibitors administered to mice. 2012;179–84.
48. Tomova R, Pomakov J, Jacobs JLL, Adjarov D, Popova S, Altankova I, et al. Changes in Cytokine Profile During Local IL-2 Therapy in Cancer Patients. 2006;2048:19–23.

## IX. ANEXO

### X.1. Anexo A. Dieta hipercalórica

<b>Product #</b>	<b>D12330</b>	
	<b>gm%</b>	<b>kcal%</b>
Protein	23.0	16.4
Carbohydrate	35.5	25.5
Fat	35.8	58.0
	<b>Total</b>	<b>100.0</b>
	<b>kcal/gm</b>	5.56
<b>Ingredient</b>	<b>gm</b>	<b>kcal</b>
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 <sub>2</sub> 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
<b>Total</b>	<b>1000.1</b>	<b>5558.5</b>

## X.2. Anexo B. Parecer do Comitê de Ética



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: 25,000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 19 de outubro de 2009

Dr<sup>a</sup> Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora